

**UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

dipl. inž. Milena N. Marjanović

**„FIZIOLOŠKI I BIOHEMIJSKI
MEHANIZMI REGULACIJE RASTENJA
PLODOVA PARADAJZA
(*Lycopersicon esculentum* Mill.)
U USLOVIMA SUŠE“**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE**

dipl. ing. Milena N. Marjanović

**„PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
MECHANISMS OF REGULATION
OF TOMATO
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) FRUIT
GROWTH IN DROUGHT CONDITIONS“**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

Mentor:

dr Radmila Stikić, redovni profesor, u penziji
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

dr Biljana Vucelić Radović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Jasmina Zdravković, naučni savetnik
Institut za povrtarstvo, Smederevska Palanka

dr Zorica Jovanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Dubravka Savić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije

Ova disertacija je rađena na Katedri za agrohemiju i fiziologiju biljaka, Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednom fakultetu i u francuskom Nacionalnom institutu za poljoprivredna istraživanja (INRA - National Institute for Agricultural Research, Avignon), u Odeljenju za genetiku i unapređenje voća i povrća. Zahvaljujem se svim članovima ovih ustanova na podršci i pomoći koju su mi pružili u toku izrade ove disertacije.

Naročitu zahvalnost dugujem prof. dr Radmili Stikić, prof. dr Zorici Jovanović i prof. dr Biljani Vucelić Radović, na ukazanom poverenju i za nesebičnu pomoć i podršku koju su mi pružale tokom doktorskih studija i koje su mi omogućile da usvojim metode i znanja koja su doprinela završetku ove disertacije. Hvala i dr Jasmini Zdarković i dr Dubravki Savić, koje su svojim iskrenim savetima pružile stručnu pomoć.

Veliku zahvalnost dugujem Slaviši Đorđeviću na bezgraničnoj pomoći u svakom trenutku izrade ove disertacije. Zahvalnost dugujem i dr Slađani Savić, dr Ljiljani Prokić, Mariji Vignjević i Bojani Špirović-Trifunović na podršci i savetima.

Želim da se zahvalim dr Mireille Faurobert i kolegama iz Instituta INRA, (Avignon), Caroline Callot, Esther Pelpoir i Leyre Karine koje su me uputile u savremene metode proteomik analiza. Zahvalnost dugujem i Benoît Valot (INRA, Moulon) koji je pomogao pri identifikaciji proteina.

Neizmerno sam zahvalna i mojoj porodici i dragim osobama koje su bile, u različitim fazama izrade ove disertacije, uz mene. Posebno hvala mojoj majci i mom suprugu na bezgraničnoj podršci i pomoći.

Fiziološki i biohemijski mehanizmi regulacije rastenja plodova paradajza (*Lycopersicon esculentum* Mill.) u uslovima suše

Abstrakt

Suša je jedan od glavnih ograničavajućih faktora u intenzivnoj poljoprivrednoj proizvodnji i zbog toga produktivnost mnogih biljaka, uključujući i paradajz, zavisi od navodnjavanja. Međutim, kao posledica globalnih klimatskih promena i zagađenja životne sredine, resursi voda za potrebe navodnjavanja su ograničeni. Nove metode redukovanog navodnjavanja (regulisani deficit navodnjavanja - RDN i delimično sušenje korenova - DSK) su pokazale da se može smanjiti količina vode za navodnjavanje, a da se to u značajnoj meri ne odrazi na kvantitet i kvalitet prinosa poljoprivrednih kultura. Razlika između metoda je u tome što se kod RDN postupka ceo korenov sistem biljaka zaliva sa smanjenom količinom vode, dok se u DSK postupku vrši naizmenično zalivanje i sušenje dela korenovog sistema. Obe metode deficita navodnjavanja su zasnovane na poznavanju fizioloških reakcija biljaka na sušu.

Cilj istraživanja ove disertacije je bio da se detaljno prouče fiziološki i biohemijski procesi koji su u osnovi regulacije rastenja i sazrevanja plodova paradajza u optimalnim uslovima vodnog režima biljaka i pod dejstvom delimičnog sušenja korenova (DSK) i regulisanog deficita navodnjavanja (RDN). Da bi se detaljnije objasnili ovi procesi ispitivani su i efekti DSK i RDN na rastenje vegetativnih organa paradajza. Kako u ispitivanim procesima ključnu ulogu ima hormon abscisinska kiselina (ABA), uporedna ispitivanja kod sorte Ailsa Craig i mutanta *flacca*, koji je deficitaran u sintezi ABA, imala su za cilj da doprinesu objašnjenju uloge ABA u reakcijama biljaka paradajza na sušu. Ispitivanja aktivnosti peroksidaze ćelijskog zida i proteomik analiza su imala za cilj da identifikuju biohemijske i metaboličke procese koji se dešavaju u toku procesa rastenja ćelija perikarpa plodova.

Eksperimenti su rađeni u fitotronske komori i za istraživanje su korišćeni sorta paradajza Ailsa Craig i mutant *flacca*, koji su gajeni u sudovima sa Potground H supstratom (Klasmann-Deilmann, Germany). Za potrebe ispitivanja DSK sudovi su specijalno dizajnirani tako što je postavljena plastična pregrada po sredini i tako su dobijena dva odeljka iste zapremine, ali koja su bila hidraulički izolovana. To je

omogućilo alternativno zalivanje i sušenje dela korenovog sistema. Kontrola sadržaja vode je vršena dnevnim merenjem zapreminskih procenata vode u supstratu pomoću TDR probe (Time domain reflectometer, TDR100, Campbell Scientific Inc., USA). Biljke su u fazi razvijenog sedmog lista izlagane sledećim tretmanima navodnjavanja: 1. optimalno navodnjavanje (ON) - ceo korenov sistem je zalivan do 36% sadržaja vode u supstratu; 2. delimično sušenje korenova (DSK) - jedna polovina korenovog sistema je zalivana do 36% vode, dok je druga polovina isušivana. Reverzija strane navodnjavanja je izvršena kada je količina vode u strani korena koji se suši opala do 18% vode; 3. regulisani deficit navodnjavanja (RDN) - ceo koren je zalivan do 18% vode. Za vreme trajanja oglada obavljena su ispitivanja: 1. vodnog režima supstrata - na osnovu merenja ukupnog sadržaja vode supstrata TDR probom; 2. rastenja i razvića biljaka - na osnovu merenja većeg broja parametara (visina biljaka, broj i dijametar ploda, suva i sveža masa listova, stabla, korena i plodova) i praćenja faza ontogeneze kod ispitivanih biljaka (BBCH skala) i 3. biohemijskih reakcija na nivou perikarpa plodova - merenja koncentracije hormona abscisinske kiseline (ELISA testom), merenja enzimske aktivnosti jonski vezane peroksidaze (gvajakol-testom) i proteomik analize (identifikacija proteina dvodimenzionalnom elektroforezom i masenom spektrometrijom). Podaci su obrađivani u odgovarajućim programima i pomoću odgovarajućih statističkih metoda analizirani (Progenesis SameSpot softvera za identifikaciju proteina, Sigma-Plot i R statistički programi za Student's *t* test i ANOVA multi-faktorska analiza varijanse).

Rezultati istraživanja su prikazani grafički (18 slika) i tabelarno (10 tabela). Rezultati merenja sadržaja vode u supstratu i dinamika promene strane navodnjavanja kod DSK biljaka su pokazali da *flacca* mutanti, zbog manje mase korena, sporije i manje usvajaju vodu iz substrata od Ailsa Craig biljaka. Rezultati za visinu biljaka i biomasu drugih organa (listovi, stablo, koren, plodovi) su takođe pokazali da je deficijencija hormona ABA kod mutanta rezultirala i značajno manjom visinom i masom u odnosu na divlji tip, sortu Ailsa Craig. Kako je hormon ABA po klasičnoj klasifikaciji hormona u fiziologiji biljaka svrstan u grupu inhibitora rastenja, očekivalo bi se da su mutanti viši od divljeg tipa. To ukazuje da se inhibitorna uloga hormona ABA mora posmatrati u interakciji sa drugim hormonima (posebno etilenom). Primena tretmana navodnjavanja imala je različit efekat na rastenje i razviće ispitivanih

genotipova. Rezultati su pokazali da je RDN postupak navodnjavanja kod oba genotipa značajno redukovao rastenje ispitivanih organa biljaka tako da su ove biljke bile manje i sa manjom produkcijom biomase u odnosu na ON i DSK biljke. Odnos suve mase korena i izdanka ukazuje da je RDN tretman imao veći uticaj na rastenje korena nego na rastenje izdanka, pa se može zaključiti da su smanjeno rastenje i apsorpciona površina korena kod ovih biljaka, direktno uticali na manje i sporije usvajanje vode. Na to indirektno ukazuju i rezultati promene sadržaja vode u supstratu gde su biljke gajene. Povećanje odnosa suve mase plodova i izdanka ukazuje da je DSK tretman uticao na translokaciju asimilata od listova i stabla ka plodovima i zatim na rastenje i razviće plodova ovih biljaka. Rezultati za RDN takođe su ukazali i na malo izmenjenu raspodelu asimilata, jer je utvrđena nešto veća akumulacija biomase u vegetativnim organima i sporiji transport ka plodovima u odnosu na kontrolne i uslove DSK. Na osnovu ispitivanja fenoloških faza razvića biljaka može se zaključiti da su u odnosu na ON biljke, tretmani DSK i RDN usporili razviće biljaka. Poređenje između ispitivanih genotipova je pokazalo da su se *flacca* biljke sporije razvijale u odnosu na Ailsa Craig, a što se može pripisati njihovoj smanjenoj mogućnosti sinteze ABA kao jednog od ključnih hormona za procese razvića biljaka, posebno u uslovima suše. Merenja brzine rasteња plodova su pokazala da se najveća brzina rasteња plodova, kod oba genotipa, ispoljila u uslovima ON, zatim DSK, a najmanja u tretmanu RDN. Krive rasteња takođe ukazuju i da su se između eksperimentalnih uslova javile razlike i u dužini trajanja i vremenu pojave maksimalne brzine rasteња plodova. Kao rezultat produženog perioda intenzivnog rasteња plodova DSK biljaka, prinos se nije statistički značajno razlikovao između ON i DSK biljaka. Kod RDN biljaka kraći period i manja brzina rasteња su doveli do obrazovanja manjih plodova i manjeg ukupnog prinosa u odnosu na plodove ON i RDN biljaka. Na osnovu analize krivih rasteња plodova može se zaključiti da je na konačnu veličinu ploda paradajza u ispitivanim eksperimentalnim uslovima više uticala dužina trajanja procesa rasteња od maksimalne brzine rasteња. Očekivano i u svim tretmanima, plodovi *flacca* biljaka su bili značajno manji, kao i ukupan prinos, u odnosu na Ailsa Craig.

Rezultati merenja efikasnosti u korišćenju vode (WUE) su pokazali da je došlo do značajnog povećanja WUE u tretmanima DSK i RDN u odnosu na ON. Iako RDN tretman povećava WUE (zbog manje količine utrošene vode za navodnjavanje),

rezultati su pokazali da je nedostatak ove tehnike što redukuje prinos. Ovi rezultati potvrđuju da se primenom DSK tehnike mogu smanjiti količine upotrebljene vode za navodnjavanje biljaka, a da se pri tome značajno ne umanju prinos. To takođe ukazuje da DSK tehnika može biti od posebnog značaja za gajenje paradajza u proizvodnim uslovima gde suša i nedostatak raspoložive vode za navodnjavanje mogu da umanje prinos.

Biohemijska ispitivanja mehanizma rastenja plodova su kod oba genotipa pokazala da se koncentracija ABA tokom razvića plodova menjala i to tako što je došlo do opadanja u fazi intenzivnog rastenja, dok je početak porasta koincidirao sa početkom sazrevanja plodova. Takođe se menjala i aktivnost enzima peroksidaze ćelijskog zida, koja je kod oba genotipa izložena DSK tretmanu nastavila da raste i kada je faza rastenja plodova završena. To ukazuje da ovaj enzim može da kontroliše sazrevanje plodova. Biohemijska ispitivanja su takođe pokazala i da je količina ABA i aktivnost enzima peroksidaze manja u plodovima *flacca* mutanta u odnosu na plodove Ailsa Craig. Uporedna analiza dinamika promene aktivnosti peroksidaze i koncentracije ABA u plodovima, ukazuje na njihov antagonistički odnos u svim tretmanima i kod oba genotipa.

Biohemijska analiza plodova je obuhvatila i proteomik analizu. Ukupno je izdvojeno 1679 proteinskih tačaka iz perikarpa ploda paradajza, kod 52 tačke je utvrđena statistički značajna razlika između tretmana, faze razvića plodova, kao i između ispitivanih genotipova. Na osnovu identifikacije proteina zaključeno je da proteini pripadaju sledećim metaboličkim kategorijama: metabolizmu ugljenih hidrata (13 proteina), metabolizmu aminokiselina (5 proteina), sintezi i degradaciji proteina (8 proteina), proteinima energetskog metabolizma (3 proteina), proteinima ćelijskog zida (5 proteina); proteinima oksidativnog stresa (8 proteina), proteinima koji učestvuju u odbrani od stresa i „heat shock“ (HSP) proteinima (4 proteina) i za 6 proteina nije utvrđena funkcija.

Analiza proteina povezanih sa metabolizmom ugljenika (prvenstveno glikolizom i TCA ciklusom) i aminokiselina je ukazala na smanjeni metabolički fluks u plodovima DSK biljaka, a što može da objasni sporije rastenje ovih plodova u odnosu na ON plodove, a to je utvrđeno i kod *flacca* u odnosu na Ailsa Craig plodove. Na osnovu porasta ekspresije proteina ćelijskog zida i proteina energetskog metabolizma, može se

pretpostaviti da je metabolički fluks orijentisan ka sintezi proteina ćelijskog zida i stvaranju neophodne energije za ćelijsko rastenje, što je omogućilo DSK plodovima produžen period rastenja, koji na kraju rezultira većim prečnikom DSK plodova u odnosu na ON plodove. Takođe je uočeno da je kod genotipa *flacca* smanjena sinteza svih proteina ćelijskog zida u odnosu na genotip Ailsa Craig, što može da bude uzrok manje veličine plodova kod mutanta u odnosu na divlji tip. Povećana sinteza nekih antioksidativnih proteina za vreme rastenja i razvića plodova u tretmanu DSK, ukazuje na to da tretman DSK (gde je korišćeno manje vode nego u ON) može da izazove blagi stres suše, koji podstiče različite odbrambene reakcije kod biljaka.

Ovi podaci su u skladu i sa značajnom ulogom peroksidaza ne samo u rastenju plodova, već i u antioksidativnoj aktivnosti koja je od posebnog značaja za otpornost biljaka na sušu. Opšte posmatrano, proteomik analiza omogućila je nov uvid u razumevanju metaboličkih i biohemijskih procesa koji su u osnovi rastenja ćelija perikarpa plodova paradajza. Ovakva dalja istraživanja, posebno u fazi sazrevanja plodova, mogu biti značajna za razumevanje efekta tretmana DSK ne samo na rastenje plodova paradajza, već i na kvalitet ostvarenog prinosa, kao i na njihovu nutritivnu vrednost.

Ključne reči: paradajz, Ailsa Craig, *flacca*, rastenje plodova, delimično sušenje korenova (DSK), regulisani deficit navodnjavanja (RDN), ABA, enzim peroksidaza ćelijskog zida, proteomik

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fiziologija gajenih biljaka

UDK broj: 635.64:623.112(043.3)

**Physiological and biochemical mechanisms of regulation of tomato
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit growth in drought conditions**

Abstract

Drought is one of the major limiting factors of intensive agricultural production and therefore productivity of many crops, including tomato, requires irrigation. However, as a consequence of global climate changes and environmental pollution, water resources available for irrigation are often reduced. New deficit irrigation methods (regulated deficit irrigation - RDI and partial root drying - PRD) demonstrated that the use of water for irrigation could be decreased without significant or with the small effects on the quantity and quality of crop yield. The difference between the methods is that with the RDI technique the entire root system of the plants is irrigated with a reduced amount of water compared to optimal irrigation, while with PRD procedure alternately watering and drying part of the root system is performed. Both deficit irrigation methods are based on an understanding of the physiological and biochemical responses of plants to water deficit.

The aim of presenting dissertation was to assess the physiological and biochemical processes that are at the base of the regulation of tomato fruit growth in optimal water regime conditions and under the influence of deficit irrigation (RDI and PRD). To explain in more detail these processes the effects of the PRD and the RDI on the growth of vegetative organs of tomato were also assessed. As in the investigated processes, plant hormone abscisic acid (ABA) plays a key role, comparative analyses with tomato variety Ailsa Craig (wild type) and *flacca* mutant (ABA-deficient) was done with the aim to better understand the role of ABA in reaction of tomato to drought. Investigation of the activity of cell wall-associated peroxidase and proteomic analyses was done with the aim to identify biochemical and metabolic processes that occurs during tomato fruit growth.

The experiments were done in phytotron chamber and for experiments were used tomato variety Ailsa Craig and *flacca* mutant grown in pots filled with substrate Postground H (Klasmann-Deilmann, Germany). The pots were specially designed for PRD experiments, such that they were separated by plastic sheets into two equal-sized

but hydraulically separated compartments. This allowed alternately watering and drying of the part of the plant root system. Control of substrate water regime was done by daily measurements of volumetric soil water content by TDR probe (Time domain reflectometer, TDR100). At the seven leaf stage, plants were exposed to investigated irrigation treatments: 1. full irrigation (FI), in which the whole root system was irrigated daily to reach a field capacity of 36%; 2. partial root-zone drying (PRD), in which the same amount of water as for FI was applied to one-half of the roots while the other half was allowed to dry. The irrigation from wet to dry side was shifted when soil water content of the dry side had decreased to 18%; 3. regulated deficit irrigation (RDI), in which the whole root system was irrigated up to 18% of water. During the experiments the following assessments were done: 1. substrate water regime -measurements by TDR probe; 2. plant growth and development - measurements of numerous parameters (plant height, number of fruits and fruit diameter, fresh and dry weights of leaves, stems, roots and fruits) and assessment of plant ontogenic phases (BBCH scale) and 3. biochemical reactions on the fruit pericarp - concentration of hormone abscisic acid (by ELISA test), enzyme activity (ionic cell wall-associated peroxidase by a guaiacol test) and proteomic analyses (protein identification by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry). The data are processed and then with the appropriate methods statistically analyzed (for protein quantification Progenesis Same Spot software was used, Sigma-Plot software and R statistical program were used for Student's *t* test and multi-factorial ANOVA).

Results of experiments are presented in the form of figures (18) and tables (10). The results of measurements of water content in the substrate and the dynamics of shifting of irrigation side in PRD plants showed that *flacca* mutants due to lower root mass, slower and less absorb water from the substrate than Ailsa Craig plants. Results for plant height and biomass of other organs (leaves, stems, roots, fruits) also showed that the ABA hormone deficiency in mutant resulted in significantly lower height and weight compared to wild-type cultivar Ailsa Craig. Since the ABA, according to the conventional plant physiology classification of hormones is placed in the group of growth inhibitors, it would be expected that the mutant is greater than the wild type. This indicates that the inhibitory role of the ABA hormone must be considered in the interaction with other hormones (particularly ethylene). The applied of irrigation

treatments had a different effect on the growth and development of the investigated genotypes. The results showed that the RDI in both genotypes significantly reduced the growth of examining organs so that these plants were smaller, and with lower production of the biomass in relation to the FI and PRD plants. The ratio of the dry weight of root and shoot indicates that the RDI treatment had a greater impact on shoot growth than on root growth, so it can be concluded that the reduced growth and absorption root areas in these plants had a direct impact on smaller and slower water uptake. At this also indirectly indicated the results of changes of water content in the substrate where the plants are grown. Increases in the ratio between dry weight of fruits and shoot indicate that the PRD treatment influenced the translocation of assimilates from the leaves of the trees to fruit and then on the growth and development of the fruits of these plants. Results for RDI also indicated a slightly altered distribution of assimilates as it is determined by something greater accumulation of biomass in the vegetative organs and slower transport to the fruits compared to the control conditions and the PRD. On the base of phenological development phases assessment it can be concluded that, treatments PRD and RDI induced the slower development of plants compared to FI plants. Comparison between Ailsa Craig and *flacca* mutant shows that the *flacca* plants were developed more slowly compared to Ailsa Craig. It can be concluded that it in the base of slower developmental of *flacca* plants compared to Ailsa Craig their reduced ability to synthesize ABA as one of the key hormone for developmental processes of plants, especially in drought conditions. Measurements of the fruit growth rate showed that the highest rate of fruit growth was in both genotypes in FI treatment, then in PRD, while the lowest was in the RDI treatment. Growth curves also showed that between experimental conditions occurred differences in the duration and timing of the maximum rate of growth of fruits. As a result of a prolonged period of intensive growth of PRD fruits, the yield was not statistically significantly different between FI and PRD plants. In an RDI conditions, shorter period of growth and slower growth rate led to the development of smaller fruits with the smaller yield compared to FI and PRD treatments. On the base of the analysis of fruit growth curves, it can be concluded that the final size of the tomato fruit in the tested experimental conditions was more affected by the duration of the process of fruit growth than by the maximum velocity of growth.

The results of water use efficiency (WUE), showed a significant increase in WUE in the PRD and RDI treatments compared to the FI. Although RDI treatment increases WUE (due to less amount of water used), the results showed that the disadvantage of this technique is that it reduces the yield. These results confirm that the application of PRD techniques can reduce the amount of water used for irrigation without reduction of yield. It also indicates that the PRD technique may be of particular benefit for the cultivation of tomatoes in conditions where drought and lack of water available for irrigation can reduce the yield.

Biochemical studies of the mechanism of growth of fruits showed in both genotypes that the concentration of ABA during the development of fruits changed in a such way that has been a decrease in the phase of intensive growth, while the beginning of the ABA increase coincided with the beginning of the ripening of the fruit. It is also shown that a significant increase in the activity of enzyme cell wall-associated peroxidase in tomato fruit pericarp under PRD conditions coincided with the end of cell growth and the beginning of the ripening process. These results pointed out that this enzyme may control tomato fruit maturation. Biochemical studies have also shown that the concentration of ABA and the activity of the enzyme peroxidase in the fruits of *flacca* mutant were smaller compared to the fruits of Ailsa Craig. A comparative analysis of the dynamics of changes in peroxidase activity and concentration of ABA in the fruits indicates their antagonistic relationship in all treatments and in both genotypes.

Biochemical analysis of fruit included also proteomics analysis. In total, 1679 spots were detected in fruit pericarp and among these identified spots, a total of 52 protein spots displayed differential abundance variation according to the treatment, stages of fruit development and genotypes. The identified proteins were classified into the following metabolic categories: carbon metabolism (13 proteins), amino acid metabolism (5 proteins), protein translation, processing and degradation (8 proteins), energy metabolism (3 proteins), cell wall related (5 proteins), oxidative stress (8 proteins), stress defence and heat shock (4 proteins) and 6 proteins whose function was unknown.

Analysis of proteins related to carbon and amino acid metabolism indicated that slower metabolic flux in PRD fruits may be the cause of a slower growth rate

comparing to FI fruits, and this is also the case of the *flacca* fruits compared to Ailsa Craig fruits. On the base of the increase in the protein expression of cell wall proteins and energy metabolism, it can be assumed that the metabolic flux was oriented to the synthesis of the cell wall and making the necessary energy for cell growth, that allowed the PRD fruits to prolonged periods of fruit growth, which finally resulted in larger diameter of PRD fruits in relation to the FI fruits. It was also observed reduced synthesis of cell wall proteins in the fruits of *flacca* plants compared to the fruits of Ailsa Craig, which can be the cause of a smaller size of mutant fruits compared to the fruits of wild type. Increased synthesis of some antioxidant protein during growth and development of PRD fruits, indicated that treatment PRD (where less amount of water than in FI was used) can cause mild drought stress, which stimulates various defense reactions in plants. These data are consistent with a significant role peroxidase not only in fruit growth, but also to the antioxidant activity which is of special importance for the resistance of plants to drought.

Generally, proteomics analysis enabled the new insight in understanding the metabolic and biochemical processes that are the basis of the growth of tomato fruit pericarp cells. Further studies, particularly in the phase of the ripening of fruits can be helpful for understanding the effects of treatment DSK, not only on the growth of fruit, but also on the quality of the tomato yields, as well as their nutritional value.

Key words: tomato, Ailsa Craig, *flacca*, fruit growth, partial root-zone drying (PRD), regulated deficit irrigation (RDI), ABA, cell wall-associated peroxidase, proteomic

Scientific field: Biotechnical sciences

Specific scientific field: Physiology of agricultural plants

UDC number: 635.64:623.112(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	6
2.1. Paradajz: istorijat, morfologija i značaj	6
2.2. Rastenje i razviće plodova.....	9
2.3. Fiziološki i metabolički procesi u toku razvića plodova	13
2.4. Hormonska kontrola rastenja i razvića plodova	15
2.5. Biohemijska kontrola rastenja plodova	22
2.6. Rastenje plodova i suša	24
2.7. Primena metoda redukovano navodnjavanja kod paradajza.....	26
3. NAUČNI CILJ I OSNOVNE HIPOTEZE	28
4. MATERIJAL I METODE	30
4.1. Biljni materijal.....	30
4.2. Postavka eksperimenta	30
4.3. Ispitivani parametri i metode.....	32
4.3.1. Vodni režim supstrata.....	32
4.3.2. Rastenje i razviće biljaka.....	33
4.3.3. Biohemijske analize na nivou plodova.....	35
4.4. Statistička obrada podataka	44
5. REZULTATI	45
5.1. Fiziološka istraživanja	45
5.1.1. Sadržaj vode u supstratu.....	45
5.1.2. Rastenje i razviće biljaka.....	47
5.1.2.1. Visina biljaka.....	47
5.1.2.2. Biomasa i njena distribucija	48
5.1.2.3. Fenološke faze	55
5.1.2.4. Rastenje plodova	59
5.1.2.5. Dinamika rastenja.....	61
5.1.2.6. Biomasa plodova	63
5.2. Biohemijske analize na nivou plodova.....	65
5.2.1. Sadržaj ABA u plodovima.....	65

5.2.2. Aktivnost peroksidaze u različitim fazama razvića plodova	71
5.2.3. Sadržaj ABA i aktivnosti peroksidaze u različitim fazama razvića plodova paradajza	77
5.2.4. Proteomik analiza	80
5.2.4.1. Analiza proteina u različitim fazama razvića ploda genotipa Ailsa Craig	81
5.2.4.2. Analiza proteina kod različitih tretmana genotipa Ailsa Craig	82
5.2.4.3. Analiza proteina kod različitih genotipova paradajza	84
5.2.4.4. Analiza proteina perikarpa paradajza pod uticajem tretmana	85
6. DISKUSIJA	90
6.1. Vodni režim supstrata	90
6.2. Rastenje i razviće biljaka	92
6.3. Rastenje i razviće plodova	97
6.4. Prinos biljaka i efikasnost usvajanja vode	101
6.5. Biohemijski mehanizmi regulacije rastenja plodova	105
7. ZAKLJUČCI	121
8. LITERATURA	127

1. UVOD

Suša je u svetu jedan od glavnih ograničavajućih faktora u intenzivnoj poljoprivrednoj proizvodnji, koji u značajnoj meri redukuje prinos i kvalitet gajenih biljaka (Foolad, 2007). Prema podacima Jajarmi, 2009, oko 25% svetskih poljoprivrednih površina je pod uticajem stresa suše. Međunarodni panel za klimatske promene (IPCC, 2014), predviđa da će i u narednim godinama efekat suše biti veoma izražen i da će doći do povećanja prosečnih temperatura (za 2°C) i koncentracije CO₂, kao i do smanjenja padavina u toku letnjih meseci, a što će biti najizraženije na područjima u kojima je umereno kontinentalna i suptropska klima. Prema evropskim prognozama iz 2008. god. (European Commission Directorate – General for Agriculture and Rural Development, 2008), u Evropi se najteže posledice globalnog zagrevanja neće, u najvećoj meri, ispoljiti pre 2050. god., ali će sve veći problem predstavljati ekstremna klimatska događanja kao što su ekstremni toplotni talasi, požari, produženi sušni periodi i sve češće poplave (EEA, 2012). Modeli klimatskih promena ukazuju i da će trend porasta temperature i smanjenja padavina biti regionalno izražen u Evropi. Prognoze su da će se količina padavina povećati u Zapadnoj i Severnoj Evropi od 5 do 15%, dok će u centralnoj, istočnoj i mediteranskoj Evropi doći do smanjenja čak za 20% (Kjellström *i sar.*, 2007). To će se odraziti i na smanjenje raspoloživih vodnih resursa za industrijske, urbane i poljoprivredne potrebe, tako da voda postaje resurs od strateškog značaja (Alcamo *i sar.*, 2007).

I u našoj zemlji negativni efekti klimatskih promena i suše na poljoprivrednu proizvodnju su veoma izraženi. Meteorološka ispitivanja pokazuju da je povećanje srednje godišnje temperature, u poslednjih pedeset godina, na području Srbije do 0,17°C dekadno, s tim što je taj trend u poslednjih deset godina višestruko uvećan. Prema proceni Popović *i sar.* (2004) u Srbiji će u toku nastupajućih letnjih meseci biti za 20-50% manje padavina.

U Srbiji, kao i zemljama jugostočne Evrope, negativno dejstvo suše se posebno odražava na gajenje i produktivnost povrtarskih kultura. Paradajz se gaji na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru i spada u ekonomski najznačajnije i najčešće gajene povrtarske kulture (Ho, 1996; Takač *i sar.*, 2007). Proizvodnja paradajza u Evropi učestvuje sa 12,8% u ukupnoj svetskoj proizvodnji paradajza, sa prosečnim prinosom

41,8 t/ha. Među najveće svetske proizvođače paradajza spadaju: Kina (50,5 miliona tona (Mt)), Indija (18,2 Mt), US (12,5 Mt), Turska (11,8 Mt) i Egipat (8,5 Mt). Zemlje koje postižu najveći prinos u proizvodnji paradajza su Belgija, Holandija i Irska, sa prosekom oko 480 t/ha (FAOSTAT, 2015). U Srbiji se paradajz gaji na 18.483,00 ha, sa prosečnim prinosom od 9,4 t/ha, a prema podacima iz 2013. godine, proizvedeno je 174.512,00 t paradajza (FAOSTAT, 2015).

Razlog malog prinosa paradajza u Srbiji, u poređenju sa drugim zemljama, je neadekvatna primena agrotehničkih mera, pre svega, navodnjavanja (Takač i sar., 2007). U proizvodnji paradajza voda je jedan od najznačajnijih faktora koji utiče na rastenje i razviće, pa je za postizanje većeg prinosa neophodno dodatno navodnjavanje (Feres i Soriano, 2007). Paradajz je biljka koja je osetljiva i na vodni deficit. Rezultati Bošnjaka i Pejića (1995) ukazuju da u Srbiji potrebe paradajza za vodom variraju od 670-1,720 mm po m², kao i da je za jedan kilogram suve mase paradajza potrebno od 300-400 litara pa do 824 litara vode. Reakcija različitih biljaka, pa i paradajza, na vodni deficit zavisi od genotipa, jačine i trajanja nedostatka vode, tipa zemljišta, starosti i faze razvića, kao i vrste organa i tkiva (Bray, 2001). Suša najviše utiče na smanjenje prinosa u fazama kada se rasad priprema za sadnju, fazi cvetanja i u fazi formiranja i rasteња plodova (Wudiri i Henderson, 1985). Niska relativna vlažnost vazduha (ispod 50%), naročito ako je praćena zemljišnom sušom, dovodi do opadanja cvetova, a često i već formiranih plodova, tako da u uslovima vodnog deficita dolazi do značajnog smanjenja prinosa i kvaliteta plodova.

Za prevazilaženje efekata suše danas se, uglavnom, koriste dva pristupa i to: stvaranje otpornih genotipova gajenih biljaka na sušu i poboljšanje agrotehničkih mera za gajenje biljaka u oblastima gde one mogu biti izložene suši. Oba pristupa su zasnovana na teorijskim znanjima o dejstvu suše na biljke i njihovim adaptivnim reakcijama. Na taj način su teorijska znanja iz fiziologije stresa biljaka našla svoju praktičnu primenu.

Stvaranje otpornih genotipova paradajza je dugotrajan proces koji zahteva pronalaženje osobina i procesa koji su u korelaciji sa otpornošću na sušu, kao i njihovu primenu u postupku selekcije. Pored toga, potrebno je i višegodišnje testiranje stepena otpornosti na sušu tako stvorenih genotipova. Preduslov za dobijanje otpornih genotipova je dobro poznavanje odgovora biljaka i adaptivnih reakcija na stres,

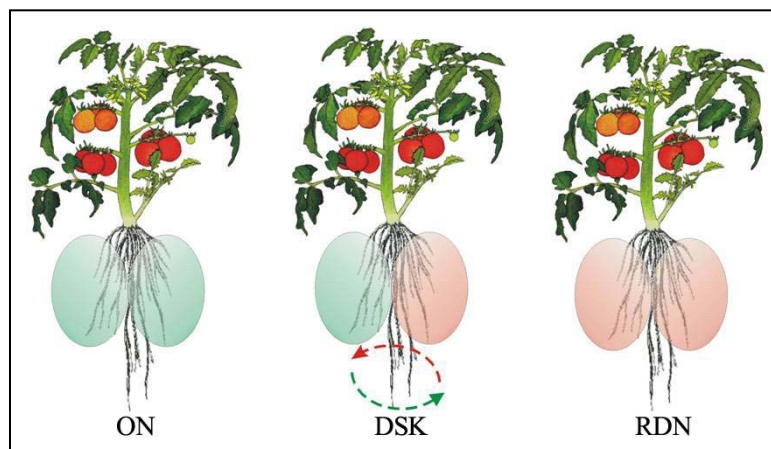
definisane relevantnih kriterijuma za ocenu tolerantnosti na sušu, izbor ključnih gena koji utiču na povećanje otpornosti prema suši i procena uticaja otpornosti na kvalitet i prinos (Zdravković *i sar.*, 2013). Smatra se da primena molekularnih metoda, zajedno sa klasičnim fiziološkim istraživanjima može dati najbolje rezultate u istraživanjima otpornosti gajenih biljaka na sušu (Foolad, 2007). Razvoj molekularnih markera omogućio je stvaranje genetičkih mapa i uz korišćenje različitih statističkih programa, sada je moguće odrediti poziciju gena za bilo koje svojstvo, tzv. QTL (eng. quantitative trait loci) koje se potom, ukoliko je u korelaciji sa otpornošću na sušu, koristi u procesu selekcije (Mackay *i sar.*, 2009).

Od agrotehničkih mera najznačajnije je navodnjavanje i tendencija je da se zbog sve učestalijih suša prošire površine koje se navodnjavaju. Prema Van Schilfgaarde (1994) od ukupne količine raspoloživih vodnih resursa za navodnjavanje poljoprivrednih kultura troši se 85% sa trendom povećanja navodnjavanih površina. Zbog povećanja potreba za hranom rastuće svetske populacije (po proceni UN-a do 2050. god. se očekuje porast stanovništva za 34% u odnosu na današnju, FAO (2015)), klimatskih promena, kao i smanjenja raspoloživih ukupnih vodnih resursa, voda za navodnjavanje se mora mnogo ekonomičnije trošiti. Zbog toga je strateški cilj globalne poljoprivredne proizvodnje racionalnije korišćenje vode za navodnjavanje i to tako da se poveća efikasnost usvajanja i korišćenja vode od strane poljoprivrednih kultura, a da se pri tome ne umanjí njihov prinos ili kvalitet prinosa (Kang i Zhang, 2004). U tom cilju su razvijene metode redukovanog navodnjavanja i to: regulisani deficit navodnjavanja ili RDN (eng. regulated deficit irrigation) i delimično sušenje korenova ili DSK (eng. partial root-zone drying). Veliki broj rezultata pokazao je da se obe metode mogu uspešno koristiti za navodnjavanje različitih poljoprivrednih kultura (Fereres i Soriano, 2007). One su zasnovane na poznavanju fizioloških reakcija biljaka na sušu i percepciji i prenosu signala suše od korena do izdanka i plodova (Chaves *i sar.*, 2003; Morison *i sar.*, 2008; Stikić *i sar.*, 2010). U kojoj meri će se uštedeti količina vode koja se u ovim metodama koristi zavisi pre svega od poljoprivredne kulture, tipa zemljišta i meteoroloških uslova (Jovanović i Stikić, 2012). Dalja usavršavanja metoda detekcije reakcija biljaka na DSK i RDN omogućila bi njihovu još efikasniju i širu primenu. Ušteda količine vode za navodnjavanje (od 30 do čak 70%) koju ove metode

omogućavaju je od posebnog značaja za zemlje čija se poljoprivreda suočava sa problemima suše i smanjene količine vode za efikasnu i održivu proizvodnju.

Regulisani deficit navodnjavanja (RDN) je metod navodnjavanja kod kog se korenov sistem biljaka zaliva sa količinom vode koja je manja od maksimalne evapotranspiracije za datu kulturu (English *i sar.*, 1990). Na taj način se biljke izlažu određenom stepenu stresa suše i one reaguju smanjenjem transpiracije (zatvaranjem stoma ili smanjenjem površine listova), dok je efekat na fotosintezu manji. U tim uslovima umerenog stresa, iako se može smanjiti produkcija biomase, to se ne mora negativno odraziti na prinos, jer se asimilati preusmeravaju ka plodovima (Wilkinson i Hartung, 2009). Za efikasno korišćenje i praktičnu primenu ove metode u proizvodne svrhe neophodno je znanje o specifičnim fazama najveće osetljivosti na sušu biljaka koje se zalivaju, kao i kontrola njihovog vodnog režima ili vodnog režima zemljišta. U zavisnosti od toga, tehniku RDN treba primeniti u fazi najmanje osetljivosti određene biljne vrste na sušu, ali se mora pored vodnog režima biljaka kontrolisati i dužina trajanja suše, da ne bi došlo do smanjenja prinosa (Jovanović i Stikić, 2012).

Tehnika delimičnog sušenja korenova je modifikacija RDN tehnike. Primena DSK podrazumeva navodnjavanje jedne strane korenovog sistema, dok se druga polovina isušuje do određenog nivoa zemljišne vlage, a zatim se strana navodnjavanja menja, tako da se navodnjava suva strana korenovog sistema, a prethodno navodnjavana se isušuje (Gowing *i sar.*, 1990). To se razlikuje od tehnike RDN, gde se manja količina vode za navodnjavanje, u odnosu na optimalno navodnjavane biljke, primenjuje na celokupan korenov sistem (Sl. 1).



Slika 1. Shema optimalnog navodnjavanja (ON), delimičnog sušenja korenova (DSK) i regulisanog deficita navodnjavanja (RDN).

Do primene DSK metoda se došlo zahvaljujući saznanjima poslednjih godina, kada je utvrđeno da do redukcije rastenja i promene otvorenosti stoma kod biljaka izloženih suši može doći na osnovu sinteze i transporta tzv. „hemijskih signala suše“ i bez promene vodnog režima u ćelijama, odnosno i bez tzv. „hidrauličnih signala suše“. Princip metode je da navodnjavanje dela korenovog sistema održava listove u hidratisanom stanju, dok korenovi koji se suše sintetišu „hemijske signale“ (uglavnom hormon abscisinsku kiselinu) koji se od korena do nadzemnog dela transportuju ksilemom i zatim deluju tako što redukuju provodljivost stoma i rastenje ćelija (Dodd *i sar.*, 1996). Dinamika zalivanja i isušivanja dela korenovog sistema zavisi od kulture, faze razvića biljke, tipa zemljišta, raspoložive količine vode u zemljištu i evaporacije (Saeed *i sar.*, 2008). Kod paradajza se obično kreće u intervalu 10 do 15 dana. Dosadašnji brojni rezultati su pokazali da se primenom obe metode kod paradajza efikasnost usvajanja vode može značajno povećati, a da se pri tome ne umanjuje prinos (Davies *i sar.*, 2000; Stikić *i sar.*, 2010).

Dalja usavršavanja metoda detekcije reakcija biljaka na DSK i RDN omogućila bi njihovu još efikasniju i širu primenu. Ušteda količine vode za navodnjavanje (od 30 do čak 70%) koju ove metode omogućavaju je od posebnog značaja za zemlje čija se poljoprivreda suočava sa problemima suše i smanjenom količinom vode za efikasnu i održivu proizvodnju.

Iako postoje brojna istraživanja i teorijske osnove za mogućnosti primene RDN i DSK metoda kod paradajza, nedovoljan je broj rezultata koji se odnose na ispitivanje uzajamne zavisnosti biohemijskih i fizioloških procesa koji se dešavaju na nivou ploda paradajza. Takva ispitivanja, a koja su predmet ove disertacije, su od posebnog značaja jer doprinose razumevanju procesa od kojih zavisi ne samo rastenje i prinos RDN i DSK plodova, već i njihova nutritivna vrednost.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Paradajz: istorijat, morfologija i značaj

Paradajz (*Lycopersicon esculentum* Mill.) je jedna od najčešće gajenih i ekonomski najznačajnijih povrtarskih kultura. Paradajz pripada botaničkoj porodici *Solanaceae*, rodu *Solanum*, vrsti koja se označava latinskim imenom *Lycopersicon esculentum* L. (Mill), ili po novijoj nomenklaturi, *Solanum lycopersicum* L. (Knapp, 2014).

Paradajz vodi poreklo iz Južne Amerike. Većina istorijskih, lingvističkih, arheoloških i etnobotaničkih podataka ukazuje da divlji paradajz, sitnih crvenih plodova, potiče iz uske priobalne andske zone koja obuhvata Peru, Ekvador, severni Čile i ostrva Galapagos. Sa ovog područja širio se na sever prema Meksiku, gde je došlo do njegove domestifikacije. Lokalno asteško i indijansko stanovništvo je birajući krupnije i ukusnije plodove izvršilo prvu selekciju i pretvorilo divlji paradajz u gajenu kulturu. U postkolumbovskom periodu paradajz prvo stiže u Španiju i Portugaliju, zatim je preko Mediterana prenesen u ostali deo Evrope, u Aziju i Afriku, a potom vraćen u Severnu Ameriku. Elektroforetska proučavanja aloenzimskog sastava pokazuju veliku sličnost između evropskih sorti, lokalnih populacija Meksika i centralne Amerike i primitivnih populacija koje se i danas sreću širom andske zone, čime se direktno potvrđuje hipoteza o poreklu paradajza (Marković, 1997).

U Evropi nije bio poznat sve do otkrića Amerike. U vreme kada su ga Španci preneli iz Perua u Evropu, nije bio upotrebljavan u ishrani, već je gajen samo kao ukrasna biljka i to verovatno zbog intenzivnog mirisa listova i plodova, kao i zbog toga što paradajz pripada porodici pomoćnica (*Solanaceae*) u kojoj se nalaze neke otrovne biljke (beladona, mandraka). Tek polovinom 18-tog veka paradajz se počeo koristiti u ishrani kao povrće, najpre u Italiji, Španiji, Portugaliji i Francuskoj. Paradajz je danas nezamenjivo i vrlo popularno povrće koje se gaji širom sveta. U našim krajevima paradajz je masovno počeo da se gaji tek polovinom 19-tog veka.

Mnogi divlji srodnici paradajza kao što su *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*, *L. chilense*, *L. peruvianum*, *L. hirsutum* i *L. pimpinellifolium* su među najbogatijim izvorima gena za hibridizaciju. Gotovo sva efektivna rezistencija na virusna oboljenja paradajza je nađena iz divljih vrsta *Lycopersicon* i *Solanum*.

Koren paradajza ima različitu građu i položaj u zavisnosti od načina gajenja. Centralni koren u direktnoj setvi dostiže dubinu od 100 do 150 cm i zahvata veliku masu zemljišta, ali se glavna masa korena razvija u površinskom sloju zemljišta (20 do 40cm). Kada se paradajz gaji preko rasada potencira se razviće bočnih korenova, dok je kod biljaka koje su gajene iz semena korenov sistem osovinski. U optimalnim uslovima zemljišne i vazdušne vlažnosti mogu da se formiraju vazdušni, adventivni korenovi iz svih zeljastih delova biljke. Naročito snažan adventivni koren se razvija iz potkotiledonog dela stabla, što je od koristi za bolje snabdevanje vodom i mineralnim elementima (Damjanović *i sar.*, 2001; Marković, 1997).

Stablo paradajza je kratko i zeljasto, zelene boje, sklono je grananju, ali sa starošću biljke odrvenjava. Kod najvećeg broja biljaka ono najčešće poleže po zemlji i zato je za njegovo gajenje neophodan oslonac. Kod mladih biljaka stablo je okruglo, a kod starijih postaje rebrasto, pokriveno je sitnim dlačicama koje luče želatinoznu masu, koja daje specifičan miris biljci paradajza. U proizvodnji se zakidaju bočni izdanci (Damjanović *i sar.*, 2001; Marković, 1997). Na osnovu habitusa i dužine trajanja perioda rastenja razlikuju se 3 tipa rastenja stabla i to: determinantan, indeterminantan i poludeterminantan. Kod determinantnog tipa stabla, sa formiranjem prve cvasti, završava se rast biljke u visinu, što glavno stablo čini niskim. Bočni izdanci se pojavljuju iz primarnog stabla dajući biljci žbunast izgled. Sorte paradajza sa indeterminantnim tipom pokazuju neograničeno rastenje, sa velikim brojem bočnih grana i daju plodove tokom cele sezone. Poludeterminantni paradajz se odlikuje dugačkim bočnim grananjem i obrazovanjem nekoliko cvasti kao i indeterminantni tip, ali se obrazovanjem cvasti obustavlja dalje rastenje (kao kod determinantnih oblika) (Damjanović *i sar.*, 2001; Marković, 1997).

Listovi paradajza su neparno perasti, spiralno raspoređeni, dorzoventralne građe sa izraženim nervima na naličju lista. Mladi listovi su prosti i po obodu usečeni, dok su stariji listovi neparno perasto složeni i sastoje se iz glavne lisne drške na kojoj su raspoređeni prosti ili složeni listovi na pojedinačnim drškama. Ovakve listove ima veći broj kulturnih sorti, dok izvestan broj sorti ima list koji svojom morfologijom liči na list krompira (Damjanović *i sar.*, 2001).

Cvetovi su sakupljeni u cvasti, a kod većine varijeteta i sorata cvet ima 6 čašičnih i 6 kruničnih listića. Prašnici su srasli u obliku konusa i potpuno obuhvataju

žig, stubić i plodnik. Cvetovi su samooplodni i žute su boje. Nalaze se na cvetnoj dršci (pedicelu).

Plod se razvija iz metamorfoziranih delova cveta i nastaje posle oplodjenja od plodnika tučka. Plodnikov zid se naziva perikarp i on ima tri sloja i to: spoljašnji (egzokarp), srednji (mezokarp) i unutrašnji (endokarp). Egzokarp ima uglavnom zaštitnu ulogu, dok je sloj mezokarpa kod ploda paradajza sočan i sadrži hranljive materije, šećere, ulja i aromatična jedinjenja, kao i vitamine koji doprinose nutritivnoj vrednosti paradajza. Plod paradajza varira u širokim granicama u pogledu veličine, oblika i boje. Veličina ploda je sortna osobina, ali ona zavisi i od uslova gajenja i primenjene agrotehnike. Plodovi se grupišu u sitne (mase ispod 60 g), srednje (mase između 60 g i 120 g) i krupne (mase iznad 120 g). Neki plodovi kao npr. sorte Volovsko srce mogu dostići i masu od 1000 g. Dijametar takođe varira kod različitih sorti od više od 10 cm do manje od 3 cm (plodovi cherry paradajza). Oblik i boja ploda su osobine varijeteta, odnosno sorte. Boja ploda može biti crvena, narandžasta i žuta. Najviše se gaje sorte sa crvenim plodovima (Damjanović *i sar.*, 2001; Marković, 1997).

Seme paradajza je smešteno u semenim komorama. Broj komora je sortna osobina i varira od 2 do 20 u jednom plodu. Sorte sa većim brojem komora imaju veći procenat semena i mekši plod. Normalno razvijen plod paradajza sadrži 100-300 semena.

Plod paradajza ima široku upotrebu u ishrani stanovništva. Koristi se kao svež, zreo plod i u vidu različitih prerađevina (sokova, kečapa, supa, pasti, itd.). O značaju ove povrtarske kulture govori podatak da sa svetskom proizvodnjom od 163,964 miliona tona u 2013. god. spada među najviše konzumirane povrtarske kulture (FAOSTAT, 2015). Prosečna potrošnja paradajza u svetu iznosi 27 kg po stanovniku, a u našoj zemlji je 16 kg po stanovniku. U Srbiji, od ukupno 309.000 ha setvenih površina na kojima se gaji povrće paradajz zauzima oko 7%, odnosno oko 20.000 ha, sa ostvarenom proizvodnjom od 180.000 tona ploda (Takač *i sar.*, 2007). Prosečan prinos u Srbiji je oko 9 tona po hektaru, što je relativno malo, naročito kada se uzme u obzir da je prosečan evropski prosek oko 40 t/ha. Razlog ovako niskog prinosa leži pre svega u neadekvatnoj tehnologiji gajenja (Takač *i sar.*, 2007), a smatra se da bi odgovarajuća primena agrotehničkih mera, pre svega navodnjavanja, omogućila postizanje visokog i stabilnog prinosa.

Plod paradajza ima izuzetna nutritivna i lekovita svojstva. U ishrani ljudi on je veoma značajan izvor minerala (K, Na, Mg, Ca, Fe, Cu, Co, B, J, Ni i posebno Ca), organskih kiselina (uključujući askorbinsku, limunsku, fumarnu, oksalnu), vitamina (A, C, B, K, E), pektina. Takođe je za dijetu veoma značajno što su plodovi nisko kalorični i sadrže malu količinu masti (94% vode, oko 4,7% ugljenih hidrata, 0,9-1,1% proteina i 0,26% ulja), a takođe ne sadrže ni holesterol. Plod paradajz je izvor i veoma značajnih jedinjenja iz grupe antioksidanata (vitamina C, fenola, α -tokoferola, karotenoida - najviše likopena). Pokazalo se da ovi antioksidanti, naročito likopen, imaju veoma značajna lekovita svojstva i da su od posebnog značaja u prevenciji srčanih oboljenja, kao i različitih vrsta kancera i drugih bolesti (Preedy i Watson, 2008).

2.2. Rastenje i razviće plodova

Rastenje svih biljnih ćelija pa i ćelija plodova, se može objasniti sa 2 osnovna procesa: ćelijska deoba i izduživanje ćelija. Potom sledi proces diferencijacije ćelija pri čemu one dostižu svoju konačnu veličinu. Deoba ćelija se odvija u posebnim meristemskim ćelijama. Preduslov za izduživanje ćelija je da one dostignu svoju turgidnost (osmotskim usvajanjem vode) i da potom dođe do rastenja primarnog ćelijskog zida. Rastenje primarnog ćelijskog zida se danas objašnjava sa biofizičkog, biohemijskog i hormonskog aspekta (Stikić i Jovanović, 2015).

Biofizički model je predložio Lockhart 1965. god. Po ovom modelu izduživanje ćelija zavisi od hidrauličkih i mehaničkih osobina ćelijskog zida. Hidraulične osobine vezane su za postojanje pozitivnih vrednosti turgora koje nastaju kao rezultat usvajanja vode od strane ćelija koje rastu. Mehaničke osobine vezane su za simultane ireverzibilne plastične promene - deformacije zida. Osnova koncepta je nastanak turgora koji obezbeđuje pokretačku snagu za povećanje zapremine ćelije, a što je rezultat usvajanja vode i simultanih promena vezanih za strukturu ćelijskog zida.

Biohemijski model objašnjava proces rastenja na osnovu biohemijskih i metaboličkih promena u zoni rastenja ćelija. Ove analize pokazuju da se u delu koji odgovara ćelijama meristema vrši intenzivna metabolička aktivnost i nakupljanje nukleinskih kiselina (neophodne za deobu ćelija), azota (potreban za sintezu proteina i to kako enzimskih, tako i proteina ćelijskog zida), ugljenih hidrata (kao supstrat disanja

i kao osmotikumi), jona (posebno P, K i Mg), enzima i hormona koji su regulatori procesa rastenja.

Od metaboličkih procesa u ćelijama zone rastenja posebno su aktivni procesi oksidativne fosforilacije i WDH ciklus, kao izvori ATP i NADPH, neophodnih za nesmetano odvijanje procesa biosinteze različitih jedinjenja. U zoni diferencijacije se takođe akumuliraju ugljeni hidrati koji su prekursori metabolita neophodnih za sintezu komponenti sekundarnog ćelijskog zida (posebno lignina) (Carrari i Fernie, 2006).

Kao rezultat rastenja i diferencijacije ćelija dolazi do formiranja određenih tkiva i organa. Kvalitet i prinos plodova paradajza zavise od dinamike rastenja i razvića i ostvarene konačne veličine plodova, tako da su ispitivanja ovih procesa od posebnog značaja. Prema Gillaspay *i sar.* (1993) rastenje i razviće plodova paradajza, slično plodovima drugih kultura, može se podeliti u četiri faze (Sl. 2) i to:

Faza I: razviće plodnika, oplodnja i obrazovanje (zametanje) plodova

Faza II: ćelijska deoba, formiranje semena i rano razviće embriona

Faza III: rastenje ćelija i sazrevanje embriona

Faza IV: sazrevanje plodova

Obrazovanje plodova zavisi od uspešnog dospevanja polena na žig tučka (polinacije), ali i od uspešne oplodnje (De Jong *i sar.*, 2009). Plodnik je sposoban da „primi“ polen samo nekoliko dana posle antezisa (što zavisi od vrste biljke), a ako ne dođe do „lepljenja“ polena za žig tučka, doći će do abscisije plodnika. Pod zametanjem plodova se podrazumeva transformacija plodnika u mladi plod, koji počinje naglo da raste posle polinacije. Za obrazovanje plodova, polinacija je neophodna, dok fertilizacija (oplodnja) nije. U slučaju da do fertilizacije ne dođe, obrazovaće se partenokarpski plodovi - plodovi bez semena (Srivastava, 2002).

Posle oplodnje i okončanja **faze I** dolazi do aktivacije ćelijske deobe u plodniku (**faza II**) pod dejstvom citokinina (najaktivnija u perikarpu i tkivu placentе). Ova faza je praćena pojavom tkiva, formiranjem semena i ranim razvićem embriona. Nakon perioda ćelijske deobe, sledećih 6-7 nedelja plodovi rastu uglavnom na račun povećanja zapremine ćelija, sve dok plod ne dostigne konačnu veličinu (**faza III**). Iako rastenje ploda zavisi i od deoba i od rastenja ćelija, povećanje veličine ćelija ipak više doprinosi konačnoj veličini ploda, a veličina ćelija placentе, lokularnog tkiva i mezokarpa se može povećati više od 10-puta (Tanksley, 2004).

U toku **faze IV** dolazi do sazrevanja plodova. Sazrevanje je aspekt razvića koji je jedinstven za plod i koji se razlikuje od procesa senescencije u listovima, jer se metaboliti ne mobilizuju i ne napuštaju plodove, već podležu transformacijama koje dovode do toga da se u plodovima u toku sazrevanja akumuliraju metaboliti od kojih zavise nutritivna i lekovita svojstva plodova. Kada plodovi završe svoje rastenje (kvantitativne promene) dolazi do njihovog sazrevanja (kvalitativne promene), što predstavlja niz genetski kontrolisanih procesa regulisanih aktivnošću fitohormona. Vizuelna manifestacija sazrevanja plodova je promena njegove boje. Kako plod sazreva pigmenti se menjaju od zelenog preko narandžastog do crvenog. Prva promena pigmenta je bleđenje zelene boje izazvana transformacijom hloroplasta u hromoplaste, a što rezultira smanjenjem koncentracije hlorofila. Početno povećanje koncentracije β -karotena dovodi do nastajanja narandžaste boje, dok je finalna crvena boja rezultat kasnije povećanja koncentracije likopena. Istovremeno sa promenom boje dešavaju se brojne metaboličke promene: dezintegriše se unutrašnji i centralni deo zida karpela, tkivo placentne omekšava kao rezultat enzimske razgradnje ćelijskih zidova i dobija želatinoznu strukturu, raste sinteza etilena, intenzivira se disanje, kiselost ploda naglo raste, a zatim postepeno opada, sadržaj skroba opada, a količina šećera se povećava. Sintetišu se i raznovrsne supstance koje doprinose karakterističnom ukusu i aromi plodova, a iščezavaju tanini i druga jedinjenja koja daju opor i gorak ukus (Carrari i Fernie, 2006; Gillaspie *i sar.*, 1993; Giovannoni, 2004).

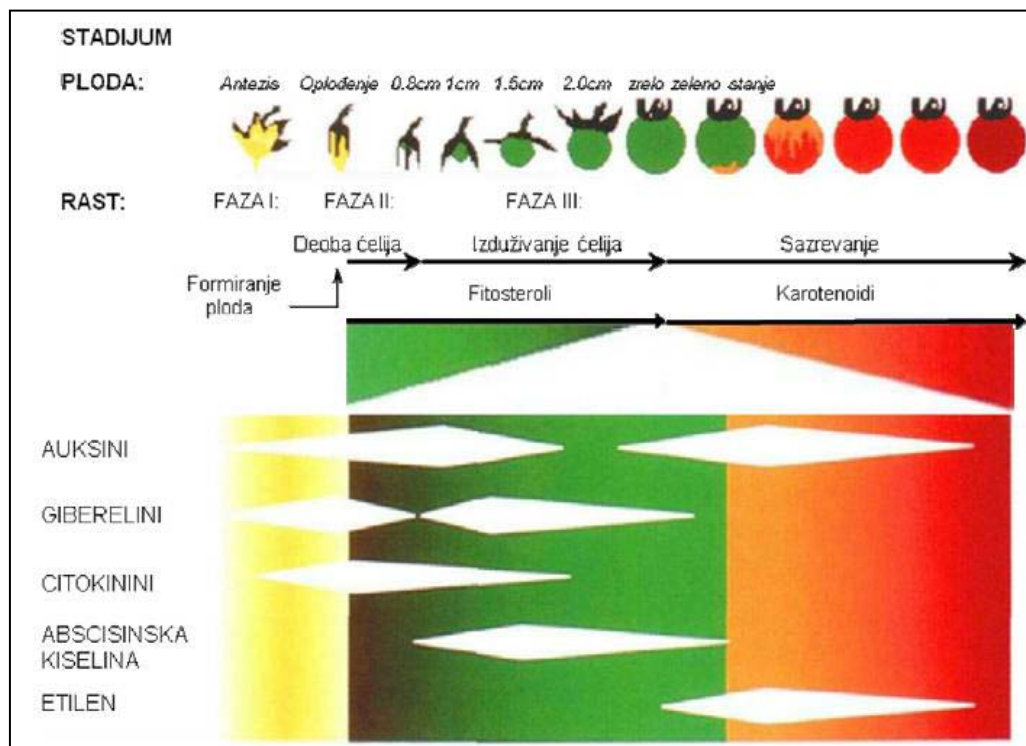
Deoba i izduživanje ćelija su i genetički uslovljeni procesi jer su praćeni ekspresijom većeg broja gena, posebno onih koji kodiraju membranske proteine i enzime, kao i enzime neophodne za odvijanje metaboličkih procesa.

Sočni plodovi se na osnovu intenziteta disanja u fazi sazrevanja plodova dele na dve kategorije i to:

1. **Klimakterični plodovi**, kod kojih za vreme sazrevanja dolazi do naglog povećanja sinteze etilena i disanja. U ovu grupu spadaju plodovi paradajza, jabuke, kruške, banane, masline, breskve, šljive.

2. **Neklimakterični plodovi**, kod kojih ne dolazi do naglih promena u sintezi etilena i disanja. Etilen je i kod ovih plodova povezan sa sazrevanjem, ali njegova koncentracija ostaje relativno niska bez naknadnog povećanja tokom sazrevanja

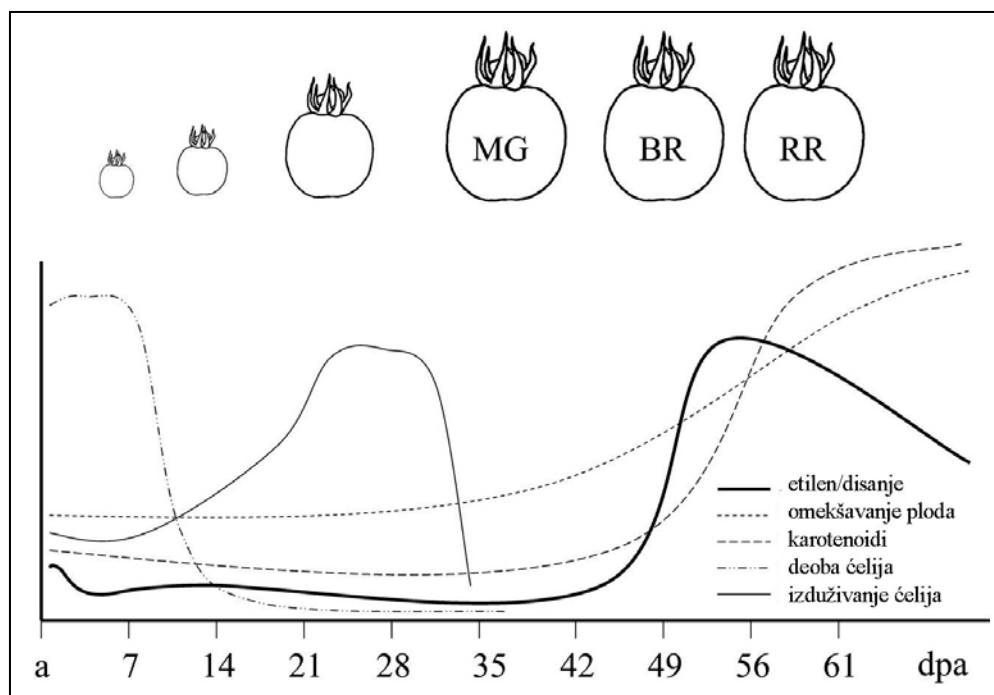
plodova. U ovu grupu spadaju plodovi vrste *Citrus*, vinove loze, jagode, lubenice, trešnje, ananasa.



Slika 2. Faze razvića plodova paradajza (modifikovano prema Gillaspay *i sar.*, 1993).

Neki autori, za razliku od Gillaspay *i sar.* (1993), razlikuju samo tri glavna perioda u rastenju ploda paradajza: deobu ćelija, fazu rastenja i fazu sazrevanja (Guichard *i sar.*, 2001).

Brzina rastenja plodova, kao i drugih organa, se može analizirati i pomoću tzv. S krivih rastenja ili krivih koje su simetrične i po obliku zvonaste (Monselise *i sar.*, 1978). One se prave tako što se prati dinamika promene u vremenskom intervalu određenih parametara plodova kao što su npr. dijametar ploda, masa, broj ćelija i sl. Oblik krive može da ukaže da li je rasteenje rezultat deobi ili izduživanja ćelija, a takođe i da se prati dinamika rastenja u toku određenih faza razvića ploda ili dejstva nekih faktora na ove procese. Na Sl. 3 predstavljene su krive rastenja ploda paradajza u različitim fazama razvića (Giovannoni, 2004).



Slika 3. Šematski prikaz promena u toku razvića ploda paradajza (MG - plod koji je dostigao svoju konačnu veličinu i kod kog je seme sazrelo; BR - plod sa prvom vidljivom akumulacijom karotenoida; RR- potpuno zreo plod – modifikovano prema Giovannoni, 2004).

Na osnovu krivih rastezanja se mogu analizirati trajanje i intenzitet procesa deobe i izduživanja ćelija i ti podaci su od značaja za razumevanje morfoloških osobina plodova kao što su njihova veličina, oblik i masa. Te karakteristike su i od posebnog značaja ne samo za ocenu kvaliteta prinosa, već i za ekonomske vrednosti plodova paradajza.

2.3. Fiziološki i metabolički procesi u toku razvića plodova

Za rastezanje i razviće plodova neophodni su metabolički procesi koji obezbeđuju asimilate i optimalni vodni balans za rastezanje ćelija. U toku tzv. zelene faze razvića plodova, plodovi su, zbog prisustva hloroplasta sposobni za fotosintezu, ali je njen udeo u stvorenoj suvoj masi ploda relativno mali (manje od 10%), tako da plodovi zavise od transporta asimilata floemom iz listova koji su najbliži plodu (Van Ieperen *i sar.*, 2003). Pravac i intenzitet transporta asimilata u prvom redu zavisi od potreba pojedinih tkiva ili organa za asimilatima. Po pravilu transport asimilata odvija se od mesta njihove sinteze, izvora (eng. *source*) ka mestu njihove potrošnje, uvira (eng. *sink*). Tako je plod koji se

razvija i čija dimenzija raste dominantan centar za privlačenje asimilata (Fanwoua *i sar.*, 2014). Prema Ho (1992) plodovi paradajza koji rastu imaju veće potrebe za vodom i asimilatima u odnosu na druge biljne organe i oni predstavljaju *sink* organe (tzv. organi uvira asimilata), a listovi su glavni izvor asimilata (tzv. organi izvori asimilata). Akumulacija heksoza kao osmotikuma u ćelijama ploda formira gradijent u osmotskom potencijalu što potom omogućava usvajanje vode i drugih asimilata tokom faze rastenja plodova paradajza (Massot *i sar.*, 2010). U toku ranog razvića ploda (pre i posle cvetanja) postoji jaka kompeticija za asimilate i između vegetativnih i reproduktivnih organa, kao što je utvrđeno kod plodova jabuke i kruške (Hayashi i Tanabe, 1991; Jackson, 2003).

Za deobu i rastenje ćelija pored asimilata su neophodni i voda i mineralne materije koji se transportuju iz stabla u plod kroz peteljku ploda, ksilemom i floemom (Matthews i Shackel, 2005). Održanje turgora je neophodno za ćelije ploda da bi mogle da se izdužuju, tako da se gubitak vode veći od optimalnih vrednosti za datu fazu razvića negativno odražava na rastenje i razviće ploda, njegovu trajnost i kvalitet. Plod paradajza sadrži 90-95% vode od sveže mase. Celokupna suva materija koja se akumulira u plodu mora se kretati ka plodu u rastvorenom obliku i preko vaskularnih tkiva peteljke (ksilemom i floemom). Plod može da gubi vodu na dva načina: transpiracijom ili ksilemom u smeru od ploda ka stablu (Guichard *i sar.*, 2001). Plod paradajza ima nizak nivo transpiracije jer ima debelu kutikulu (Andrews *i sar.*, 2002) i nema stome (Johnson *i sar.*, 1992). Transpiracija plodova je od značaja ne samo za vodni režim plodova, već i za transport mineralnih elemenata. Do usvajanja vode od strane plodova dolazi zbog toga što gubitak vode transpiracijom snižava vrednost potencijala vode i turgora u plodu i povećava vrednost osmotskog potencijala u odnosu na listove. Tako obrazovan gradijent potencijala vode uslovljava da se voda i mineralne materije transportuju ka plodovima ksilemom. Kod sočnih plodova voda se može transportovati i floemom i ksilemom, ali sa različitim udelom zavisno od faze razvića ploda. Kod mladih plodova paradajza količina vode koja ulazi u plod ksilemom se smanjuje sa sazrevanjem ploda (Bondada *i sar.*, 2005). Smatra se da je to rezultat redukcije ksilema i povećanja floema u peteljci i da zbog toga dolazi do velike tzv. „hidraulične otpornosti“ za protok vode u plodovima (André *i sar.*, 1999).

Smanjenje transporta vode ksilemom (povećana „hidraulična otpornost“) se odražava i na transport jona, posebno Ca^{2+} koji je slabo mobilan element (Ho *i sar.*, 1987; Ho i White, 2005). Smanjeni unos Ca^{2+} u plodove dovodi do pojave karakterističnih nekrotičnih lezija na distalnim delovima plodova (posebno kod paradajza) koje se nazivaju BER (eng. blossom-end rot, BER). Ova pojava je najviše izražena u uslovima stresa suše ili soli.

Savremeni pristup u istraživanjima razvića plodova i njihovog sazrevanja su tzv. “omiks” analize kao što su metabolomik (Bénard *i sar.*, 2015) ili proteomik (Faurobert *i sar.*, 2007b; Marjanović *i sar.*, 2012; Palma *i sar.*, 2011), a koje mogu značajno da doprinesu razumevanju procesa koji se dešavaju u toku sazrevanja plodova. Na osnovu metabolomik analize Bénard *i sar.* (2015) su identifikovali oko 70 metabolita u listovima i 60 u plodovima i utvrdili njihove promene u zavisnosti od eko-fizioloških uslova gajenja paradajza, kao i da mnogi od njih zavise od pristupačnosti saharoze.

Rezultati proteomik analize (Palma *i sar.*, 2011) kod različitih plodova (paradajza, vinove loze, citrusa, jabuke) su pokazali da metabolički procesi u toku sazrevanja plodova zavise od ispitivanih genotipova i od agro-ekoloških uslova u kojima se sazrevanje ostvaruje. Razlike u proteinima između zrelih i nezrelih plodova, kao i dinamika njihove akumulacije u plodovima ovih biljaka, doprinose razumevanju ne samo njihovog konačnog prinosa i kvaliteta, već i njihovog nutritivnog i lekovitog značaja. Proteomik analiza plodova paradajza (Faurobert *i sar.*, 2007b) je pokazala da u toku sazrevanja plodova dolazi do promene velikog broja proteina od kojih su 15 povezani sa metabolizmom ugljenih hidrata, 5 sa fotosintezom i disanjem, 9 sa metabolizmom amino kiselina, 5 sa sekundarnim metabolitima, a po 1 sa metabolizmom vitamina i lipida. Takav savremeni koncept proteomik analize je primenjen i u ovoj disertaciji za ispitivanje rastenja plodova paradajza sorte Ailsa Craig i mutanta *flacca* u uslovima optimalnog navodnjavanja i delimičnog sušenja korenova.

2.4. Hormonska kontrola rastenja i razvića plodova

Kod biljaka hormoni igraju posebno značajnu ulogu u procesima rastenja, tako da je na osnovu njihovog dejstva izvršena i podela na stimulatore rastenja (auksini, giberelini i citokinini) i na inhibitore rastenja (abscisinska kiselina i etilen). Njihovo dejstvo na nivou ćelija se ostvaruje preko membranskih fenomena koji su u osnovi promene pH

koja je neophodna za rastenje ćelija, ali i preko sinteze proteina i enzima potrebnih za razgradnju ili sintezu komponenti zida (Stikić i Jovanović, 2015).

Dejstvo biljnih hormona na rastenje i razviće je mnogostruko. Mogu direktno da deluju na pojedine procese na membranama kao što su npr. transport jona koji reguliše otvaranje i zatvaranje stoma ili na enzime ćelijskog zida od kojih zavisi rastenje ćelija. Dejstvo fitohormona zasnovano je na uključivanju (aktivaciji) određenih gena, jer u njihovom odsustvu ne dolazi do početka fizioloških reakcija. Hormoni specifično kontrolišu ekspresiju gena i regulacija dejstva hormona zasnovana je na diferencijalnoj aktivaciji i inaktivaciji gena u pojedinim fazama razvića, kontroli na nivou transkripcije i translacije, aktivacije i inaktivacije enzima i efektima na membrane. Pored toga biljni hormoni imaju i modifikatorsko dejstvo tj. kontrolišu brzinu fizioloških procesa i utiču na međusoban balans hormona. Na taj način, oni određuju pravce diferencijacije ćelija što omogućava regulaciju sinhronog razvića pojedinih organa i tkiva (Stikić i Jovanović, 2015).

Efekti hormona se mogu generalno sumirati na sledeći način. Brzi efekti **auksina** se ostvaruju stimulacijom protonske ekskrecije u ćelijskom zidu (aktiviraju H^+ /ATP-azu), što dovodi do povećanja kiselosti u ćelijskom zidu (od 7 do 4,5). Kao posledica ovih promena u pH dolazi do aktivacije ekspanzina i drugih enzima zida, što dovodi do slabljenja veza u zidu i njegovog istezanja. Istovremeno dolazi i do promene elektrohemijskog potencijala što ubrzava usvajanje jona koji iz zida ulaze u citoplazmu i tako se stimuliše osmotsko usvajanje vode. Usvajanje vode povećava turgor koji je neophodan za rastenje i izduživanje ćelije. Auksini takođe deluju i na ekspresiju gena što omogućava ćelijama koje se izdužuju da u veoma kratkom vremenskom periodu produkuju nove proteine neophodne za zonu izduživanja ćelija. Neki od ovih proteina su i transkripcioni faktori koji vrše aktivaciju ili represiju drugih gena (Stikić i Jovanović, 2015).

Giberelini utiču na hemijski sastav ćelijskog zida, kao i na sintezu njegovih komponenti. Utvrđeno je da povećavaju aktivnost XET, smanjuju aktivnost peroksidaza ćelijskog zida, ali utiču i na obrazovanje kovalentnih veza koje povezuju proteine ćelijskog zida. Na taj način, zajedno sa auksinima, omogućavaju izduživanje ćelija. Aktivnost **citokinina** u procesu rasta je vezana za stimulaciju ćelijske deobe (Stikić i Jovanović, 2015).

Abscisinska kiselina (ABA) ima inhibitorno dejstvo na rastenje. Ona inhibira protonsku pumpu na nivou plazmamembrane i na taj način sprečava acidifikaciju ćelijskog zida koja je neophodna za izduživanje. Pored toga utiče na promene u sastavu ugljenih hidrata zida, odnosno ima inhibitorno dejstvo u toku sinteze celuloze i hemiceluloze (Stikić i Jovanović, 2015).

Etilen takođe može da redukuje rastenje biljaka. Od posebnog značaja je interakcija između ABA i etilena u rastenju i razviću izdanaka i korena.

Sve faze i procesi u razviću plodova su, takođe, kontrolisane hormonima i to tako da su auksini aktivni tokom svih faza rasta i razvića ploda (oplođenje, deoba, izduživanje i sazrevanje), citokinini utiču na deobu, giberelini na deobu i izduživanje ćelija, abscisinska kiselina (ABA) ima najveći uticaj na izduživanje ćelija plodova, dok je etilen odgovoran za proces sazrevanja (Gillaspy *i sar.*, 1993).

Auksini su odgovorni za rastenje ćelija u tkivu ploda. Rezultati Gillaspy *i sar.* (1993) su pokazali da se koncentracija auksina u plodu paradajza dva puta povećava za vreme razvića plodova. Prvo povećanje u količini auksina se javlja oko 10 dana posle antezisa, što se podudara sa početkom rasta ćelija, a drugo se javlja kasnije u razviću plodova i poklapa se sa finalnom fazom u razviću embriona. Auksini se sintetišu u polenu, ali i u endospermu i embrionu semena koje se razvija (Taiz i Zeiger, 2010). Kada polen padne na žig tučka dolazi do ekspresije tzv. auksin signalnih gena, kao što su *Aux/IAAs* ili *AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs)* u koje spadaju: *DIAGEOTROPICA (DGT)*, *AUSCIA*, *IAA9*, *SIARF7* geni. Međutim, mehanizam *ARF* još uvek nije jasan. Nije još uvek poznato da li je akumulacija auksina posledica povećane sinteze auksina, smanjene degradacije ili nagomilavanja auksina transportom iz drugih biljnih delova (De Jong *i sar.*, 2009).

Koncentracija **giberelina** raste za vreme maksimalnog porasta ćelija, kada se koncentracija auksina u plodu smanjuje (Gillaspy *i sar.*, 1993). Za vreme razvića ploda paradajza, takođe postoje dva povećanja u akumulaciji giberelina, koji su u skladu sa ćelijskom deobom, na početku faze II i rasta ćelije u fazi III. Utvrđeno je da giberelini u toku faze I stimulišu klijanje polena i rastenje polenove cevčice (Gillaspy *i sar.*, 1993). Jedina poznata signalna komponenta giberelina koja je uključena u obrazovanje ploda je *SIDE*LLA. *DE*LLA proteini ograničavaju širenje (povećanje) ćelija tako što blokiraju gene odgovorne za sintezu giberelina. Stoga, *SIDE*LLA geni spadaju u

negativne regulatore obrazovanja plodova, jer ograničavaju signale giberelina i na taj način utiču na porast plodnika (De Jong *i sar.*, 2009). Za mehanizam dejstva giberelina se pretpostavlja da je takav, da oni povećavaju elastičnost ćelijskog zida i utiču na osmotski potencijal (Srivastava i Handa, 2005).

Za povećan intenzitet deobe ćelija ploda su odgovorni **citokinini** (Srivastava i Handa, 2005). Povećanje koncentracije citokina u plodu se dešava na početku faze II, što se poklapa sa fazom intenzivne deobe ćelija (Gillaspy *i sar.*, 1993). Većina citokina je izmerena u semenu koje se razvija, a veoma malo u perikarpu i tkivu placente. Veruje se da se citokinini ne stvaraju u semenu, već da se do njega transportuju, ali da seme kontroliše brzinu njihovog transporta. Mehanizam kojim citokinini unapređuju proces deobe ćelija u plodu nije potpuno poznat, ali se zna da mogu da regulišu procese u G2 fazi interfaze ili prelazak iz G2 u mitozu ćelijskog ciklusa (Cowan *i sar.*, 2001).

Hormon **abscisinska kiselina (ABA)** ima takođe značajnu ulogu u razviću ploda i semena. Koncentracija ABA u omotaču semena raste tokom razvića, a sadržaj u okolnom tkivu opada. Sadržaj vode u semenu i okolnom tkivu je sličan u početnim fazama razvića, ali je potencijal vode i osmotski potencijal u embrionu niži nego u okolnom tkivu u fazi rastenja ćelija.

ABA je od posebnog značaja za biljke jer se kao "stres" hormon akumulira u biljkama izloženim dejstvu različitih abiotičkih i biotičkih stresnih faktora i ima ključnu ulogu u njihovim reakcijama na stresne faktore. Takođe, ABA je uključena i u druge procese rastenja i razvića biljaka (izduživanje, klijanje, dormanciju, abscisiju i dr.), metaboličke procese, kao i u regulaciji vodnog režima (Jovanović i Stikić, 2012; Stikić i Jovanović, 2015). Za razumevanje ovako složene uloge ABA, ali i drugih hormona, posebno su značajni mutanti ABA kod kojih je usled poremećaja u sintezi ABA smanjena njena koncentracija, kao što je to mutant *flacca* koji je korišćen u našim istraživanjima.

Abscisinska kiselina predstavlja seskviterpenoid i u svojoj građi ima šestočlani prsten sa jednom dvogubom vezom za koji je vezan nezasićeni lanac sa karboksilnom grupom. Specifičan put biosinteze ABA kojim se ovaj proces u plastidima odvaja od biosinteze karotenoida, zapravo započinje konverzijom zeaksantina u violaksantin u dvostepenoj epoksidaciji (Setha *i sar.*, 2004). Raspadom ovih karotenoida obrazuje se

ksantoksin koji prelazi iz plastida u citoplazmu. Od ksantoksina se obrazuje ABA-aldehid koji oksidacijom pomoću enzima aldehid-oksidade prelazi u abscisinsku kiselinu (Sagi *i sar.*, 1999).

Kod paradajza su poznata tri ABA mutanata: *notabilis*, *flacca* i *sitiens*, homozigoti za recesivne mutacije jednog gena (Linforth *i sar.*, 1990). Prema Taylor *i sar.* (1988) kod genotipova *flacca* i *sitiens* je blokiran poslednji korak puta biosinteze ABA. Oni imaju mutaciju na genu koji kodira enzim za prevođenje ABA aldehida u ABA. Aktivnost aldehidne oksidaze zavisi od molibdenskog kofaktora, u koji se prvo ugradi sumpor delovanjem sulfuraze sa *ABA3* gena (Wasilewska *i sar.*, 2008). Tokom *de novo* sinteze ABA u hloroplastima se obrazuje 9'*cis*-epoksikarotenoid-dioksigenaza, NCED (eng. 9'*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase) koja *cis*-neoksantin prevodi u citoplazmatski ksantoksin. To su prvi prekusori u sintezi ABA. Kod paradajza, 9'*cis*-epoksikarotenoid-dioksigenaza je kodirana LeNCED1 genom. Kod *notabilis*-a se javlja mutacija LeNCED1 gena (Burbidge *i sar.*, 1999). Mutacije gena kod ovih mutanata smanjuju oksidacioni kapacitet oba enzima koji su ključni za biosintezu ABA (aldehidne oksidaze i ksantin-dehidrogenaze). Međutim, iako je kapacitet mutanata za sintezu ABA smanjen, oni još uvek mogu da akumuliraju određenu količinu ABA. Herde *i sar.* (1999) su utrdili da *notabilis* i *flacca* sadrže ABA u količini koja je 47% i 21% od divljeg tipa.

ABA mutanti se i fenotipski razlikuju od divljeg tipa. Oni se odlikuju smanjenim rastom, manji su im plodovi i imaju morfološke simptome karakteristične za višak etilena, kao što su kovrdžanje listova i pojava adventivnih korenova, čak i u uslovima kad su dobro snabdeveni vodom (Nagel *i sar.*, 1994; Pećinar, 2015; Rančić, 2011; Sharp *i sar.*, 2000). Razlike između mutanata i divljeg tipa se ispoljavaju ne samo kod vegetativnih, već i reproduktivnih organa. Tako je veličina i masa ploda značajno manja kod *flacca* u odnosu na divlji tip (Nitsch *i sar.*, 2012; Pećinar, 2015; Rančić, 2011). ABA se svrstava u grupu hormona inhibitora rastenja biljaka, pa bi se očekivalo da su mutanti deficitarni u koncentraciji ABA veći od divljeg tipa. Paradoksalno je i da egzogena primena ABA dovodi do porasta mutanata tako da oni skoro dostižu visinu divljeg tipa (Nagel *i sar.*, 1994; Neill *i sar.*, 1986). Jedno od objašnjenja za manji rast ABA deficitarnih mutanata je veća produkcija etilena kod ovih biljaka (Neill *i sar.*, 1986). Rezultati Sharp *i sar.* (2000) i Dodd (2003), su pokazali da blokirana sinteza

etilena delimično povećava površinu listova. Na osnovu ovih i drugih sličnih podataka Sharp *i sar.* (2000) su predložili da je jedna od uloga ABA u rastenju da neutrališe inhibitorno dejstvo etilena na rast izdanka. Prema ovom konceptu interakcije ABA i etilena, uloga ABA je da „kontrolira“ da koncentracija etilena ne poraste i inhibira rastenje. Veća produkcija etilena kod mutantnih biljaka (Neill *i sar.*, 1986) može da redukuje i razvoj ksilema (Zobel i Roberts, 1978) i tako inhibira polarni transport auksina (Beyer i Morgan, 1971). Auksini sa svoje strane utiču i na rastenje ćelija i na razvoj elemenata ksilema (Sugiyama i Komamine, 1990). Promene u građi ksilema se mogu odraziti na transpiracioni tok i transport vode i mineralnih elemenata, što opet indirektno utiče na rastenje i razviće mutantnih biljaka. Transpiracija je zbog smanjene sinteze ABA kod mutanata povećana u odnosu na divlji tip, tako da se mutanti mnogo brže suše. Rezultati ispitivanja kod *flacca* biljaka su pokazali da su u suši vrednosti potencijala vode u listovima mnogo niže, a provodljivost stoma veća u odnosu na divlji tip (Prokić, 2009).

Koncentracija ABA u plodovima se menja u toku rastezanja i sazrevanja plodova. Ona dostiže maksimum u fazi intenzivnog rastezanja ćelija (Gillaspy *i sar.*, 1993). Međutim, postoje i podaci da je visoka koncentracija ABA izmerena u ranijim fazama rastezanja ploda (Kojima, 1996; Smith *i sar.*, 1995), kao i da je njena koncentracija najveća u lokulima i semenima plodova (Kojima *i sar.*, 1993). Za vreme razvića semena, koncentracija ABA je najveća u fazi povećanja ćelija, a zatim opada u kasnijoj fazi razvića ploda. Povećana koncentracija ABA se dovodi i u vezu sa sintezom etilena u toku sazrevanja plodova. Rezultati više autora su potvrdili da inhibicija sinteze ABA u plodovima smanjuje sintezu etilena i odlaže sazrevanje plodova (Jia *i sar.*, 2011; Sheng *i sar.*, 2008; Zhang *i sar.*, 2009). Rezultati Nitsch *i sar.* (2012) su kod mutanata *flac/noc* sa dvostrukom mutacijom, pokazali da je količina ABA smanjena ali da je nivo etilena povećan što potvrđuje ulogu ABA u stimulisanju rastezanja plodova, tako što smanjuje koncentraciju etilena. Savremena molekularna istraživanja su pokazala i da u plodovima klimakteričnih, ali i neklimakteričnih plodova količina ABA predstavlja rezultat dinamičnog balansa između biosinteze (odgovorni *NCED* geni), katabolizma (*CYP707A* geni) i njihove reaktivacije (*BG/GT* geni), tako da promena nekog od ovih procesa menja koncentraciju ABA u plodovima (Leng *i sar.*, 2014).

Etilen je hormon čija je uloga od posebnog značaja za sazrevanje plodova i to posebno klimakteričnih. U toku klimakteričnog disanja odavanje CO_2 i usvajanje O_2 se povećava za 2-3 puta. Etilen koji se obrazuje u plodovima podstiče klimakterično disanje (Srivastava, 2002). Uloga etilena u procesu sazrevanja plodova je višestruka. On deluje kao „motor pokretač“ sazrevanja jer potpomaže kodiranje enzima za biosintezu karotenoida, metabolizma šećera, degradaciju ćelijskog zida i antioksidativnu aktivnost. Za smanjenu sintezu etilena (pre faze sazrevanja plodova), a kasnije za povećanje sinteze etilena (u vreme sazrevanja plodova), odgovorni su etilen ACC sintetaza (ACS) i ACC oksidaza (ACO). Oba enzima kodiraju multigenske familije. Njihova sinteza se dešava u specifičnim tkivima za vreme razvića i oni mogu biti indukovani hormonskim signalima i uslovima spoljašnje sredine. Gen specifične probe u paradajzu su pokazale da različite vrste ACS gena deluju prilikom ranih faza razvića, kao što su ACS1 i ACS3, a ACS2 i ACS4 deluju u fazi sazrevanja plodova, kada dolazi do povećanje sinteze etilena (Srivastava, 2002).

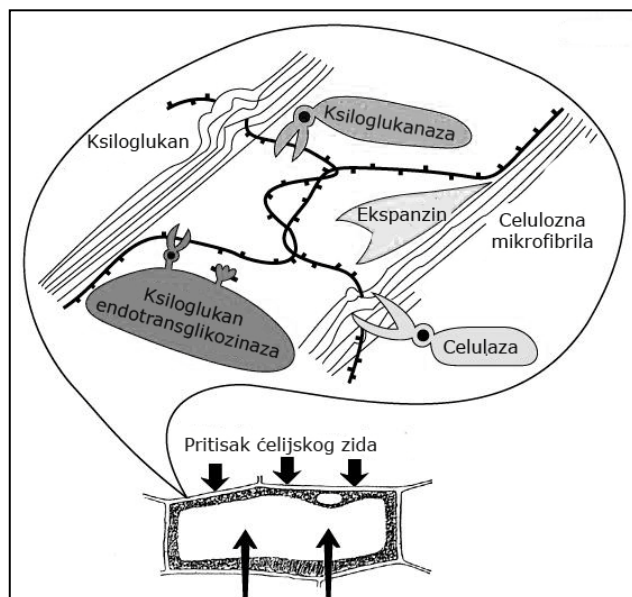
Rezultati Zhang i sar. (2009) pokazuju i da akumulacija ABA prethodi akumulaciji etilena. To ukazuje da je uloga ABA od presudnog značaja za početak sazrevanja, dok je uloga etilena bitnija u kasnijoj fazi sazrevanja plodova. Novija ispitivanja sa mutantima paradajza kod kojih je mutacijom onemogućeno sazrevanje plodova pokazuju da se razlike između klimakteričnih i neklimakteričnih plodova ne ispoljavaju samo u produkciji etilena. Kada je egzogeno primenjen etilen kod ovih mutanata nije došlo do sazrevanja i ekspresije etilenom regulisanih gena sazrevanja. Iako je bilo ustanovljeno da etilen aktivira transkripciju nekoliko gena u vrlo ranoj fazi zrenja ploda, to nije slučaj za sve gene koji kodiraju proteine sazrevanja, jer kod nekih gena aktivacija prethodi povećanoj sintezi etilena. Prema tome, još uvek je nejasno kako je transkripcija etilen-nezavisnih gena ili inicijacija procesa zrenja kontrolisana programom razvića ploda. To sve ukazuje i da, pored generalno prihvaćenog koncepta u kome sazrevanje obe kategorije plodova zavisi od biosinteze i signala za etilen, postoje i drugi regulatorni faktori koji kontrolišu sazrevanje plodova (Leng i sar., 2014).

Još uvek postoji dosta kontroverzi ne samo o ABA i etilenu već i o drugim hormonima. Ispitivanja Kumar i sar. (2014) koja se odnose na ulogu hormona u procesu formiranja, rastanja i sazrevanja plodova, kao i genske regulacije sinteze i akumulacije hormona, ukazuju na to da se generalno može zaključiti da su auksini, giberelini i

citokinini primarni regulatori formiranja plodova, kao i da auksini i citokinini regulišu rastenje, a ABA i etilen sazrevanje plodova.

2.5. Biohemijska kontrola rastenja plodova

Biohemijska kontrola izduživanja ćelija zasnovana je na tome da se u toku ćelijske ekspanzije menja biohemijski sastav ćelijskog zida i da u biohemijskoj regulaciji rastenja učestvuju 3 osnovne grupe enzima: ekspanzini, ksiloglukan-endotransglikozilaza i peroksidaza. Ovi enzimi potpomažu da oslabe veze u rigidnoj strukturi primarnog ćelijskog zida koja onemogućava njegovo istežanje (Sl. 4).



Slika 4. Model delovanja enzima zida na rastenje ćelija (modifikovano prema Pekić-Quarre i sar., 2005).

Ekspanzini su enzimi koji katalizuju reverzibilnu ekspanziju ćelijskog zida. Oni nemaju hidrolitičku aktivnost da razlažu komponente zida, već pri promeni pH (od 6.8 do 4.5) “odlepljuju i guraju” polisaharide od celuloznih mikrofibrila i tako raskidaju nekovalentne H veze između polimera ćelijskog zida (McQueen-Mason i Cosgrove, 1995).

Ksiloglukan-endotransglikozilaza (XET) je enzim koji raskida („seče“) veze u lancu polisaharida ksiloglukana na manje ili veće fragmente i tako ih odvaja od

mikrofibrila koji zato postaju labavi. Ovi enzimi i prenose ove isečene fragmente na neki drugi lanac (Palmer i Davies, 1996).

Zajedničkim dejstvom proteina i enzima zida dolazi do slabljenja veza u matriksu i opadanja turgora tako da se usvaja voda i pod dejstvom smanjenog praga turgora zid se isteže. Pošto se usled slabljenja veza u jednom delu zid razgrađuje, a to izaziva stvaranje veza u drugom delu, ne postoji mogućnost da se zid skroz razgradi. Završetak rastenja ćelija obuhvata redukciju ekstenzibilnosti zida, tj. očvršćavanje strukture zida. Tu je od značaja uloga enzima peroksidaze.

Peroksidaze (EC.1.11.1.7), su enzimi, koji spadaju u grupu oksidoreduktaza i katalizuju reakcije oksidacije različitih supstrata u prisustvu vodonik peroksida. Reakcije koje katalizuju peroksidaze su: sinteza lignina, reakcije oksidacije fenolnih jedinjenja estarski vezanih za polisaharide ćelijskog zida, formiraje mostova izoditirozina za koje se pretpostavlja da povezuju strukturne molekule proteina, učestvuju u metabolizmu auksina i dr. Uloga peroksidaza u zoni rastenja ćelija je da kada se formira novi zid “zaključa zajedno” celulozne mikrofibrile i spreči njihovo rastezanje, dok peroksidaza u zoni diferenciranih ćelija učestvuje u metabolizmu lignina i tako potpomaže stvaranje sekundarnog zida (Fry, 1986; Passardi *i sar.*, 2004).

Rezultati istraživanja većeg broja autora su pokazali i da peroksidaza ćelijskog zida ima ulogu u biohemijskoj inhibiciji rastenja ćelija lista i ploda u suši (Bacon *i sar.*, 1997a; Đaković i Jovanović, 2003; Jovanović *i sar.*, 2004; Savić *i sar.*, 2008; Vucelić Radović *i sar.*, 2008). Rose *i sar.* (1997) i Thompson *i sar.* (1998) su takođe pokazali da je aktivnost XET i ekspanzina u korelaciji sa rastenjem ploda. Geni za enzime superoksid-dismutazu i katalazu su takođe identifikovani u plodu paradajza u fazi sazrevanja. Ovi enzimi imaju antioksidativnu aktivnost i uglavnom se sintetišu u stresnim uslovima ili kod infekcije patogenima, ali njihova uloga u procesima sazrevanja plodova još uvek nije jasna (Srivastava, 2002).

U našim istraživanjima je praćena ukupna aktivnost enzima peroksidaze ćelijskog zida sa ciljem objašnjenja biohemijskih promena koje se dešavaju u toku izlaganja biljaka Ailsa Craig i *flacca* tretmanima suše i delimičnog sušenja korenova. Rezultati Ismail i Phizackerley (2009), Savić *i sar.* (2008) i Vucelić Radović *i sar.* (2008) su pokazali da peroksidaza može da učestvuje u regulaciji rastenja plodova paradajza gajenih u uslovima delimičnog sušenja korenova. Veći broja autora je

pokazao da se u toku rastenja plodova menja ne samo aktivnost peroksidaze, već i njenih izoformi (Andrews *i sar.*, 2002; Andrews *i sar.*, 2000; Thompson *i sar.*, 1998).

2.6. Rastenje plodova i suša

Rastenje ćelija je jedan od najosetljivijih procesa na dejstvo suše, tako da je smanjen porast biljaka i njihovih organa jedan od prvih vidljivih znakova suše. Suša utiče na rastenje ćelija preko redukcije broja i/ili veličine ćelija. Suša utiče na proces deobe tako da se obrazuje manji broj ćelija čije su i dimenzije manje, što kasnije za posledicu ima redukciju veličine plodova. Efekat umerene suše na rastenje ćelija je rezultat biofizičkih i biohemijskih promena, prvenstveno na nivou zida. Biofizičke promene su vezane za hidrauličke i mehaničke osobine ćelijskog zida, dok su biohemijske uslovljene aktivnošću nekoliko enzima ćelijskog zida (ksiloglukan-endotransglikozilaze – XET, peroksidaze, ekspanzina), kanala akvaporina, kao i dejstvom hormona (abscisinske kiseline i auksina) i pH vrednosti apoplasta. Opadanje potencijala turgora u ćelijama redukuje plastičnost (ekstenzibilnost) ćelijskog zida, i povećava aktivnost enzima koji inhibiraju rastenje ćelijskog zida, posebno peroksidaze (Jovanović i Stikić, 2012).

U uslovima suše dolazi do zatvaranja stoma (Mansfield *i sar.*, 1990) kako bi biljka sačuvala neophodnu vodu za nesmetano odvijanje fizioloških procesa. Međutim, usled redukovane provodljivosti stoma, dolazi do smanjenja transpiracije, pa tako i efikasnijeg korišćenja vode od strane biljke (Tahi *i sar.*, 2007). Zatvaranjem stoma dolazi do redukcije usvajanja CO₂ (Chaves, 1991) i smanjenja fotosinteze što neposredno dovodi do inhibicije rastenja (Holbrook *i sar.*, 2002).

Prema podacima Takač *i sar.* (2007) potrebe paradajza za vodom variraju od 670-1720 mm po m², a kada vlažnost zemljišta padne ispod 70-80 % poljskog vodnog kapaciteta dolazi do usporavanja rastenja biljaka paradajza i smanjenja prinosa. Kod paradajza, najveći uticaj na redukciju prinosa vodni deficit ima u periodu cvetanja i fazi intenzivnog rastenja plodova, tako što se smanjuje broj formiranih cvetova, povećava abortivnost cvetova i negativno utiče na rastenje plodova (Rančić, 2011; Wudiri i Henderson, 1985). Prema Wudiri i Henderson (1985) navodnjavanje u toku faze cvetanja i plodonošenja povećava prinos za 55-87%. Pored redukcije veličine i broja ćelija ploda paradajza (Pećinar, 2015; Rančić, 2011), u uslovima vodnog deficita dolazi

i do smanjenja brzine rastenja i skraćivanja vegetacionog perioda, što takođe utiče na redukciju prinosa (Samarah, 2005; Savić, 2008).

U uslovima suše dolazi i do različitih metaboličkih promena u plodu paradajza. Povećava se sinteza aktivnih oksidativnih supstanci i slobodnih radikala (Sofo *i sar.*, 2004; Sofu *i sar.*, 2005), koje mogu da izazovu oštećenja na ćelijskim membranama (Smirnoff, 1993). Kako bi održale neometano rastenje i razviće, biljke imaju sposobnost da eliminišu ove supstance na dva načina, enzimskim (Smirnoff, 1993) i neenzimskim (Noctor i Foyer, 1998) antioksidantima. U enzimске antioksidante spadaju proteini: superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutationperoksidaza (GPX) i enzimi askorgat-glutation ciklusa (AsA-GSH), askorbat-peroksidaza (APX), monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR) i glutation-reduktaza (GR). U neenzimske antioksidanse spadaju: askorbinska kiselina (AsA), glutation (GSH), karotenoidi, tokoferoli i fenoli (Sharma *i sar.*, 2012).

Mogućnost regulacije enzimskog antioksidativnog sistema od strane biljaka je povezano sa tolerancijom na sušu, jer može sprečiti oštećenja koja mogu biti izazvana uticajem oksidativnih supstanci (Sofo *i sar.*, 2005). U dosadašnjim istraživanjima zabeležen je porast aktivnosti peroksidaza ćelijskog zida (Bacon *i sar.*, 1998; Jovanović *i sar.*, 2004), ali i drugih enzimskih antioksidanata u uslovima suše (Aganchich *i sar.*, 2007). Ovi enzimi utiču i na promene mehaničkih osobina ćelijskog zida (indukuju lignifikaciju), izazivaju inaktivaciju auksina, što dovodi do obustavljanja rastenja, a što je u korelaciji sa adaptacijom na sušu (Sofo *i sar.*, 2005).

U uslovima suše u plodovima paradajza raste i sadržaj neenzimskih antioksidativnih supstanci, što pozitivno utiče na kvalitet plodova (Stikić *i sar.*, 2003). Povećanje sadržaja suvih materija u plodovima paradajza u uslovima suše mogao bi biti rezultat smanjenog transporta vode, a samim tim i njenog procentualno manjeg sadržaja u plodovima (Ehret i Ho, 1986; Willumsem *i sar.*, 1996).

U literaturnim podacima, postoji malo informacija o fiziološkim i biohemijskim promenama koji se dešavaju u toku rastenja i razvića plodova (Faurobert *i sar.*, 2007b; Rocco *i sar.*, 2006), kao i uticaja stresa suše na metaboličke promene u plodu paradajza.

2.7. Primena metoda redukovanog navodnjavanja kod paradajza

U literaturi postoje različiti podaci o efektima metoda redukovanog navodnjavanja na paradajz. U većini radova gde je primenjivana tehnika DSK rezultati pokazuju da količina vode za navodnjavanje može da se smanji za 30-50% bez većeg uticaja na prinos. Pri tome dolazi do povećanja efikasnosti korišćenja vode (eng. water use efficiency – WUE) i poboljšanja kvaliteta ploda paradajza (Davies *i sar.*, 2000; Kirda *i sar.*, 2004; Savić *i sar.*, 2008; Tahi *i sar.*, 2007; Zegbe-Domínguez *i sar.*, 2003; Zegbe *i sar.*, 2004). Kod primene tehnike RDN utvrđeni su heterogeni rezultati; značajno smanjenje prinosa paradajza gajenog u stakleniku primetili su Pulupol *i sar.* (1996), dok Mitchell *i sar.* (1991) i Zegbe-Domínguez *i sar.* (2003) u ogledu sa paradajzom gajenim u poljskim uslovima primenom RDN tehnike nisu utvrdili značajan gubitak prinosa. Jedna od čestih negativnih posledica primene tehnike RDN kod paradajza je pojava nekrotičnih pega na plodovima (eng. blossom end rot – BER), što je posledica smanjenog transporta kalcijuma ka plodu (Adams i Ho, 1993).

Kako je teorijska osnova tehnike DSK zasnovana na indukciji biohemijske reakcije biljaka na stres suše, promenu strane zalivanja korenovog sistema bilo bi najbolje izvršiti kada zapreminski sadržaj vode u zemljištu odgovara maksimalnoj koncentraciji ABA u ksilemskom soku (Liu *i sar.*, 2008). Na ovaj način zalivana strana korenovog sistema omogućava održanje vodnog statusa nadzemnog dela biljke, a hemijski signali (ABA) koji se sintetišu u isušivanom delu korenovog sistema prenose se ksilemom u nadzemni deo biljke (Dodd, 2007) i imaju inhibitorni uticaj na rastenje listova, jer se zatvaraju stome i redukuje se fotosinteza. Na ovaj način smanjuje se transpiracija i povećava se efikasnost korišćenja vode (Davies *i sar.*, 2000; Souza *i sar.*, 2003). Pored ABA kao hemijskog signala, za regulaciju kontrole korišćenja vode na nivou listova, utiču i drugi hemijski signali indukovani umerenim stresom suše. Uočeno je da sa porastom koncentracije ABA dolazi do povećanja pH ksilemskog soka (Holbrook *i sar.*, 2002; Mingo *i sar.*, 2003; Sobeih *i sar.*, 2004), ali i drugih hemijskih signala kao što su koncentracija neorganskih jona i drugih biljnih hormona (Stoll *i sar.*, 2000; Wilkinson, 1999).

Adekvatnom primenom tehnike DSK kod paradajza može da se uštedi i do 50% vode za navodnjavanje bez veće redukcije prinosa (Kirda *i sar.*, 2004). U istoj studiji je uočeno da navodnjavanje tehnikom DSK utiče na smanjenje lisne površine i

vegetativnog porasta i da su fotosintetski asimilati usmereni ka plodovima. Zegbe *i sar.* (2004) su u slično postavljenom eksperimentu uočili da DSK tehnika navodnjavanja ne utiče na redukciju prinosa, ali da se povećava efikasnost korišćenja voda za 70% u odnosu na optimalno navodnjavane biljke. Tehnika DSK takođe utiče na povećanje kvaliteta plodova paradajza i povećanje WUE (Davies *i sar.*, 2000). Prema rezultatima Savić *i sar.* (2008) i Stikić *i sar.* (2003) DSK utiče na povećanje ukupnog sadržaja šećera u plodovima paradajza. Pri korišćenju DSK tehnike treba voditi računa o količini vode u zasušivanoj strani, da ne bi došlo do pojave jake suše koja bi onemogućila funkcionisanje korena i usvajanje vode.

Generalno posmatrano, razlike između tehnika DSK i RDN se najviše ispoljavaju na WUE i na kvalitet i prinos plodova. Tehnika DSK se pokazala manje efikasna kod WUE u odnosu na RDN kod različitih biljnih kultura uključujući i paradajz (Kirda *i sar.*, 2005; Liu *i sar.*, 2006a; Wakrim *i sar.*, 2005), ali je zato davala bolje rezultate kod prinosa i kvaliteta plodova (Kang i Zhang, 2004; Kirda *i sar.*, 2004; Leib *i sar.*, 2006; Savić, 2008; Shahnazari *i sar.*, 2007; Stikić *i sar.*, 2003; Topcu *i sar.*, 2007; Zegbe *i sar.*, 2004). De la Hera *i sar.* (2007) i Ahmadi *i sar.* (2010), sugerišu da na razlike između primena tehnika DSK i RDN najveći uticaj imaju: hormonalne promene koje su rezultat dugoročne primene DSK tretmana na rastenje i razviće, razlike između hemijskih signala koji su indukovani primenom ove dve tehnike, različitost u načinu usvajanja vode, rastenju korena i redistribuciji vode, jer utiče na sintezu hemijskih signala u isušivanom delu korena. Pored toga, dužina trajanja i najadekvatnije vreme primene DSK tehnike zavisi od biljne kulture, ali i od tipa zemljišta (Sepaskhah i Ahmadi, 2010).

3. NAUČNI CILJ I OSNOVNE HIPOTEZE

Cilj istraživanja ove disertacije je da se detaljno prouče fiziološki i biohemijski procesi koji su u osnovi regulacije rastenja i sazrevanja plodova paradajza u optimalnim uslovima vodnog režima biljaka, pod dejstvom delimičnog sušenja korenova (DSK) i regulisanog deficita navodnjavanja (RDN). Kako u ispitivanim procesima ključnu ulogu ima hormon abscisinska kiselina (ABA), uporedna ispitivanja kod sorte Ailsa Craig i mutanta *flacca*, koji je deficitaran u sintezi ABA, imala su za cilj da doprinesu objašnjenju uloge ABA u reakcijama biljaka paradajza na sušu.

Cilj fizioloških istraživanja je bio da objasne uticaj primenjenih tretmana na rastenje i razviće, ne samo plodova, već i vegetativnih organa (korena, stabla i listova), a koji mogu da doprinesu razumevanju procesa koji se dešavaju u toku izlaganja biljaka suši. Cilj biohemijskih analiza je bio da se ispituju hormonska regulacija (na osnovu akumulacije stres hormona abscisinske kiseline) i enzimska regulacija (na osnovu aktivnosti enzima peroksidaze ćelijskog zida) procesa rastenja ćelija perikarpa plodova. Proteomik analize i identifikacija proteina u perikarpu plodova imali su za cilj da detaljno objasne metaboličke procese koji se dešavaju u toku rastenja plodova i pod dejstvom ispitivanih tretmana. Cilj ovakvog integralnog fiziološkog i biohemijskog pristupa analizi rastenja plodova, uz analizu rastenja vegetativnih organa i efikasnosti korišćenja vode, je da doprinese razumevanju ne samo procesa koji se dešavaju u uslovima optimalnog snabdevanja biljaka vodom, već i DSK i RDN efekata na rastenje i prinos plodova paradajza kao i na njihov kvalitet i nutritivnu vrednost. To bi takođe ukazalo na mogućnosti praktične primene metoda redukovano navodnjavanja u proizvodnji paradajza, posebno u onim uslovima gde suša i nedostatak vode za navodnjavanje mogu da ograniče prinos paradajza.

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sledeće hipoteze:

- Procesi rastenja i sazrevanje plodova paradajza kod ispitivanih biljaka razlikovaće se u zavisnosti od primenjenog tretmana (ON, RDN i DSK), kao i da će efekat RDN biti mnogo više izražen nego efekat DSK tretmana.
- U osnovi razlika između efekata DSK i RDN tretmana na plodove paradajza su razlike u fiziološkim i biohemijskim procesima, a u kojima ključnu ulogu ima stres hormon abscisinska kiselina (ABA). Zbog toga se i očekuje da će se u svim tretmanima

ispoljiti značajna razlika između *flacca* mutanta (deficitarnog u sintezi ABA) i divljeg tipa (ispitivane sorte paradajza Ailsa Craig).

- Razlike u reakcijama rastenja ispitivanih biljaka kod oba genotipa i pod dejstvom tretmana će se ispoljiti i u usvajanju vode iz supstrata i distribuciji biomase između ispitivanih organa (korenovi, listovi, plodovi), a to će se zatim odraziti na rastenje, prinos i efikasnost korišćenja vode ispitivanih biljaka.
- Efekat suše na rastenje biljaka i plodova paradajza u tretmanu RDN će biti mnogo više izražen nego u tretmanu DSK i stoga se očekuje da se DSK tretmanom može uštedeti voda za navodnjavanje, a da se pri tome ne umanji prinos paradajza.
- Pretpostavka je da će aktivnost enzima peroksidaze ćelijskog zida, koncentracija hormona ABA i proteomik analiza objasniti, sa biohemijskog aspekta, procese koji se kod ispitivanih biljaka dešavaju u toku rastenja ćelija perikarpa plodova, a od kojih zavisi ne samo veličina plodova već i njihov kvalitet i nutritivna vrednost.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Biljni materijal

Za potrebe istraživanja korišćene su biljke paradajza *Lycopersicum esculentum* Mill., Ailsa Craig – divlji tip i mutant *flacca*. *Flacca* je mutant kod koga je poremećena biosinteza ABA i to u fazi oksidacije ABA aldehida do abscisinske kiseline (ABA). Zbog toga *flacca* ima manju koncentraciju ABA u odnosu na Ailsa Craig (Imber i Tal, 1970). Semena paradajza su dobijena od Tomato Genetics Resource Center, Department of Plant Sciences, University of California, Davis, USA.

4.2. Postavka eksperimenta

Eksperimenti su rađeni u toku 2008., 2009., 2010. i 2011. godine u fitotronskej komori Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Uslovi u komori za gajenje biljaka su bili sledeći: temperatura dan/noć 26/17°C, relativna vlažnost vazduha 60%, osvetljenost (PAR) 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i dužina fotoperioda od 14^h.

Seme paradajza je naklijavano u supstratu Postground H (Klasmann-Deilmann, Germany) u kontejnerima od stiropora (Sl. 5). U fazi potpuno razvijenog sedmog lista, biljke su presađene u posude zapremine 20 l koje su napunjene sa 11 kg supstrata Postground H. Ove posude su specijalno dizajnirane za potrebe ogleda, postavljanjem plastične pregrada po sredini posude dobijena su dva odeljka iste zapremine, koja su bila međusobno hidraulički izolovana (Sl. 5).



Slika 5. Biljke paradajza u kontejneru od stiropora (levo); Dizajn posude za potrebe ogleda (desno).

Prilikom presađivanja, korenovi biljaka paradajza su ravnomerno podeljeni na dva dela i odstranjen im je glavni koren. Zasađeni su tako da je jedna polovina korena postavljena u levi, a druga u desni deo pregrađene posude. Posle sadnje, sve biljke su svakodnevno navodnjavane do poljskog vodnog kapaciteta supstrata (θ 36%). Vodni kapacitet, oba odeljka, meren je svakodnevno uz pomoć TDR proba. Deset dana nakon presađivanja, kada su se biljke oporavile i ukorenile, otpočelo se sa tri različita tretmana navodnjavanja, koja su se primenjivala do kraja ogleada.

U toku ogleada primenjena su tri tretmana navodnjavanja (Sl. 6):

1. **Optimalno navodnjavanje - ON (eng. Full irrigation)** kada je kompletan korenov sistem zalivan do poljskog vodnog kapaciteta supstrata od 36%.

2. **Delimično sušenje korenovog sistema - DSK (eng. Partial root-zone drying)** gde je jedna polovina korenovog sistema zalivana do optimalnog vodnog kapaciteta (36%), dok je druga polovina isušivana do 18%. Zatim je izvršena rotacija, tako da je isušivana strana u narednom periodu bila zalivana do optimalnog vodnog kapaciteta, a zalivana strana je isušivana do 18% vodnog kapaciteta supstrata. Ovakve naizmenične rotirajuće promene su primenjivane do kraja vegetacionog perioda. U odnosu na uslove optimalnog navodnjavanja, za navodnjavanu stranu korena korišćeno je oko 70% vode. Strana korena koja nije navodnjavana je ostavljena da se isuši do zapreminskog sadržaja vode u supstratu od oko 18%, što odgovara količini vode u RDN tretmanu.

3. **Regulisani deficit navodnjavanja - RDN (eng. Regulated deficit irrigation)** tako što je kompletan korenov sistem zalivan do količine vode u supstratu od 18%. Ta količina vode je za oko 50% manja u odnosu na uslove optimalnog navodnjavanja.

Sadržaj vlage u zemljištu meren je svakodnevno u 9:00^h, a potom je supstrat zalivan po potrebi u zavisnosti od primenjivanog tretmana i izmerene količine vode u supstratu.



Slika 6. Postavka eksperimenta u fitotronskoj komori.

4.3. Ispitivani parametri i metode

Za vreme trajanja ogleda obavljena su ispitivanja:

- Vodnog režima supstrata
- Rastenja i razvića biljaka
- Biohemijskih reakcija na nivou plodova

4.3.1. Vodni režim supstrata

Količina vode u supstratu je merena pomoću aparata TDR (eng. Time domain reflectometer, TDR100, Campbell Scientific Inc., USA). TDR je uređaj koji sa velikom preciznošću meri vlažnost supstrata pomoću elektromagnetnih pulseva, frekvencije od 600 MHz do 1,2 GHz. TDR probe dužine 20 cm su bile instalirane u oba hidraulički nezavisna odeljka, pa je na taj način omogućeno praćenje količine vode u dva odeljka iste posude (Sl. 7).



Slika 7. Uređaj za merenje vlage u supstratu – TDR.

4.3.2. Rastenje i razviće biljaka

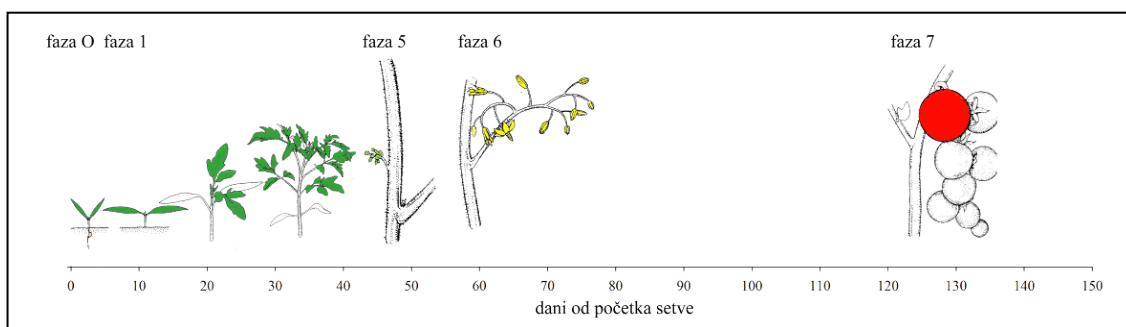
Kao pokazatelji rastenja i razvića biljaka praćeni su: visina biljaka, dijametar ploda, suva i sveža masa listova, stabla, korena, plodova i broj plodova. Takođe, jedanput nedeljno, su praćeni parametri neophodni za određivanje faze razvića biljaka i to: broj listova, broj bočnih grana, broj cvetnih grana, broj otvorenih cvetova i prečnik plodova. Na osnovu ovih podataka i poređenjem sa standardnom BBCH skalom (Tab. 1; Sl. 8) za familiju *Solanaceae* (Meier, 2001) praćen je efekat ispitivanih tretmana na fenofaze razvića paradajza.

Tabela 1. Skala fenoloških faza za familiju *Solanaceae* – BBCH (Meier, 2001).

Faza	Podfaza	Objašnjenje faze i podfaze
0		Klijanje
	00	Suvo seme
	01	Seme počinje da bubri
	03	Bubrenje semena završeno
	05	Iz semena se pojavljuje korenak
	07	Pojavljuje se hipokotil sa kotiledonima iz semenjače
	09	Kotiledoni izbijaju na površinu zemlje
1		Razvoj listova
	10	Kotiledoni potpuno rašireni
	11	Prvi pravi list na glavnom stablu neotvoren
	12	Drugi list na glavnom stablu neotvoren
	13	Treći list na glavnom stablu neotvoren
	14	Četvrti list na glavnom stablu neotvoren
	15	Peti list na glavnom stablu neotvoren
	16	Šesti list na glavnom stablu neotvoren
	17	Sedmi list na glavnom stablu neotvoren
	18	Osmi list na glavnom stablu neotvoren
2*	19	Devet ili više listova na glavnom stablu neotvoreni
		Formiranje bočnih izdanaka
	21	Prva primarna bočna grana vidljiva
	22	Druga primarna bočna grana vidljiva
	23	Treća primarna bočna grana vidljiva
	24	Četvrta primarna bočna grana vidljiva
	25	Peta primarna bočna grana vidljiva
	26	Šesta primarna bočna grana vidljiva
	27	Sedma primarna bočna grana vidljiva
	28	Osma primarna bočna grana vidljiva
	29	Devet ili više primarnih bočnih grana vidljivo
5		Pojava cvasti
	51	Prva cvast vidljiva (prvi pupoljak ispravljen)
	52	Druga cvast vidljiva (prvi pupoljak ispravljen)
	53	Treća cvast vidljiva (prvi pupoljak ispravljen)
	54	Četvrta cvast vidljiva (prvi pupoljak ispravljen)
	55	Peta cvast vidljiva (prvi pupoljak ispravljen)

6	56	Šesta cvast vidljiva (prvi pupoljak ispravljen)
	57	Sedma cvast vidljiva (prvi pupoljak ispravljen)
	58	Osma cvast vidljiva (prvi pupoljak ispravljen)
	59	Devet ili više cvasti vidljivo
		Cvetanje
	61	Prva cvast: prvi cvet otvoren
	62	Druga cvast: prvi cvet otvoren
	63	Treća cvast: prvi cvet otvoren
	64	Četvrta cvast: prvi cvet otvoren
	65	Peta cvast: prvi cvet otvoren
7	66	Šesta cvast: prvi cvet otvoren
	67	Sedma cvast: prvi cvet otvoren
	68	Osma cvast: prvi cvet otvoren
	69	Devet ili više cvasti sa otvorenim cvetovima
		Razvoj plodova
	71	Prva grana sa plodovima: prvi plod dostigao tipičan oblik i veličinu
	72	Druga grana sa plodovima: prvi plod dostigao tipičan oblik i veličinu
	73	Treća grana sa plodovima: prvi plod dostigao tipičan oblik i veličinu
	74	Četvrta grana sa plodovima: prvi plod dostigao tipičan oblik i veličinu
	75	Peta grana sa plodovima: prvi plod dostigao tipičan oblik i veličinu
8	76	Šesta grana sa plodovima: prvi plod dostigao tipičan oblik i veličinu
	77	Sedma grana sa plodovima: prvi plod dostigao tipičan oblik i veličinu
	78	Osma grana sa plodovima: prvi plod dostigao tipičan oblik i veličinu
	79	Deveta grana sa plodovima: prvi plod dostigao tipičan oblik i veličinu
		Zrenje plodova
	81	10% plodova ima boju karakterističnu za zrele plodove
	82	20% plodova ima boju karakterističnu za zrele plodove
	83	30% plodova ima boju karakterističnu za zrele plodove
	84	40% plodova ima boju karakterističnu za zrele plodove
	85	50% plodova ima boju karakterističnu za zrele plodove
9	86	60% plodova ima boju karakterističnu za zrele plodove
	87	70% plodova ima boju karakterističnu za zrele plodove
	88	80% plodova ima boju karakterističnu za zrele plodove
	89	Puna zrelost: Plodovi imaju boju karakterističnu za zrele plodove
		Starenje
	93	Počinke opadanje listova
	95	50% listova otpalo
	97	Biljke mrtve
	99	Žetva

* Kod paradajza sa indeterminantnim rastenjem stabla i samo jednom simpodijalnom granom na odgovarajućoj osi, formiranje bočnih grana se javlja istovremeno sa pojavom cvasti, pa kodiranje fazom 2 nije neophodno.



Slika 8. Šematski prikaz pojedinih faza razvoja paradajza.

Visina biljaka je merena pomoću lenjira. Na kraju eksperimenta izbrojan je broj plodova, izmerena je sveža masa listova, stabla, korena i plodova, a zatim je biljni materijal sušen na 80-100°C do konstantne mase. Na osnovu ovih podataka je izračunata suva masa listova, stabla, korena i plodova. Takođe je određen i odnos suve mase vegetativnog nadzemnog dela i korena, kao i odnos suve mase plodova i izdanka. Rastenje plodova je mereno svakodnevno. Prečnici plodova su mereni digitalnim nonijusom (Carl Roth, Germany). Na osnovu prečnika plodova nacrtane su krive koje predstavljaju dinamiku rastenja plodova u toku ispitivanog vremenskog perioda.

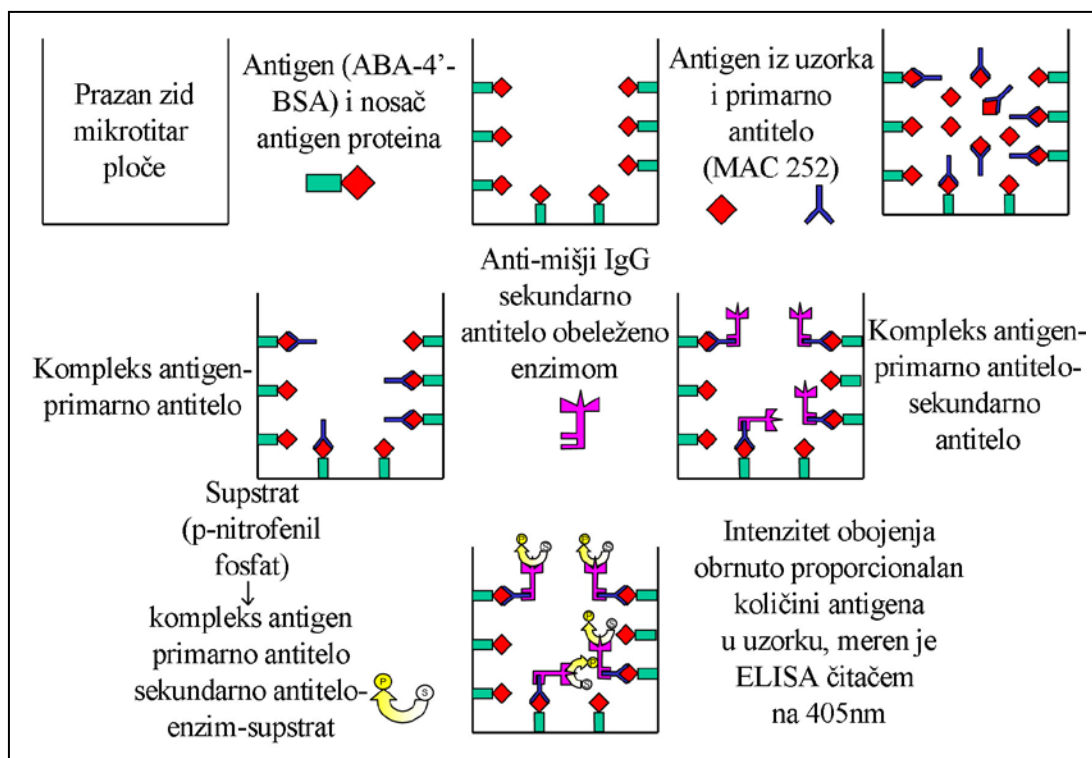
4.3.3 Biohemijske analize na nivou plodova

Ova ispitivanja su obuhvatila merenja u perikarpu plodova sadržaja hormona abscisinske kiseline (ABA), aktivnosti enzima peroksidaze ćelijskog zida i proteomik analizu.

Određivanje koncentracije abscisinske kiseline (ABA)

U eksperimentima je merena koncentracija hormona abscisinske kiseline (ABA) koji ima ključnu ulogu u reakcijama biljaka na sušu. Za određivanje koncentracije abscisinske kiseline je korišćen ELISA test (Asch, 2000). Princip kompetitivnog ELISA testa zasniva se na imunološkoj reakciji visoko specifičnog monoklonskog antitela (MAC 252) sa abscisinskom kiselinom (ABA) (Sl. 9). Pri tome ne dolazi do ukrštene reakcije između antitela sa drugim supstancama u ispitivanom uzorku (Quarrie *i sar.*, 1988). Zidovi otvora mikrotitar ploča obloženi su abscisinskom kiselinom koja se takmiči sa abscisinskom kiselinom iz uzorka za povezivanje sa limitiranom količinom primarnog antitela (MAC 252). Količina primarnog antitela, koja je obrnuto proporcionalna količini abscisinske kiseline u uzorku, vezuje se preko abscisinske

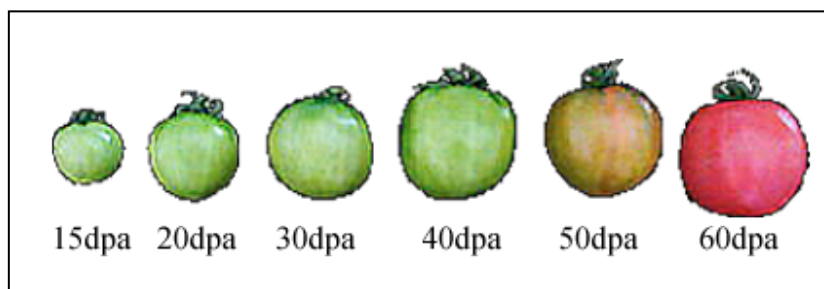
kiseline za zidove otvora. Zatim se dodaje enzimom obeleženo sekundarno antitelo koje se specifično povezuje sa primarnim antitelom. Posle imunološke reakcije, vrši se bojenje dodatkom supstrata (p-nitrofenil fosfata), pri čemu se apsorbancija rastvora očitava na ELISA čitaču na 405 nm. Ova očitana vrednost obrnuto je proporcionalna koncentraciji ABA, koja se izračunava preko standardne (kalibracione) krive dobijene merenjem serije standardnih rastvora poznatih koncentracija ($\pm$) ABA.



Slika 9. Šematski prikaz ELISA testa (modifikovano prema Asch, 2000).

Ekstrakcija ABA

U toku vegetacionog perioda i na kraju eksperimenta prikupljeni su uzorci za analizu abscisinske kiseline iz perikarpa plodova. Kod sakupljenih plodova, dinamika promene sadržaja ABA praćena je po fazama razvića ploda, u odnosu na početak cvetanja. Plodovi paradajza su sakupljeni: 15., 20., 30., i 45. dana posle antezisa (dpa) i u fazi biološke zrelosti (Sl. 10). Posle skidanja perikarpa uzorci su čuvani do analize u zamrzivaču na -80°C .



Slika 10. Dinamika razvoja ploda.

Neposredno pred analizu izvršena je ekstrakcija ABA iz biljnog materijala. Uzorci su samleveni u analitičkom mlinu (A-11 basic, IKA) uz prisustvo tečnog azota. Odmereno je 60 µg biljnog tkiva i pomiješano sa 1,5 ml destilovane vode i 2% PVP40. Uzorci su mućkani 16^h u mraku, na 4°C (Thermomixer comfort, Eppendorf). Nakon toga, uzorci su centrifugirani 5 minuta, na 4°C pri brzini od 14000 obr./min (Sigma 2-16K, Germany), a dobijeni supernatant je korišćen za dalju analizu.

Pre analize, testom ukrštene reakcije, potvrđeno je da ekstrakt ne sadrži supstance koje reaguju sa antitelom, a da nisu antigeni, tj. abscisinska kiselina.

ELISA test

Procedura ELISA testa se sastoji iz niza koraka. Prvo se otvori mikro-titar ploče oblažu sa po 200 µl ABA konjugata (ABA-4'-BSA), a zatim se preko noći obavlja inkubacija na 4°C. Nakon toga, ploča se ispire tri puta puferom 2 (TRIZMA, MgCl i NaCl i BSA – serumski albumin govečeta rastvoreni u H₂O, pH 7,8). Prilikom trećeg ispiranja, pufer 2 se u otvorima ploče inkubira 20' na 37°C, da bi se saturisali neobloženi delovi sa BSA. Unapred napravljen raspored za punjenje ploče je sledeći - pipetira se: 100 µl vode za pozitivnu kontrolu (B+), 100 µl ABA rastvora koncentracije 80000 pg (±)ABA/100 µl za negativnu kontrolu (B-), 100 µl svakog standardnog rastvora (4000, 2000, 1000, 500, 250 i 125 pg (±)ABA/100µl) i 100 µl uzoraka. Zatim se u svaki otvor otpipetira po 100 µl primarnog antitela (MAC 252). Mikro-titar ploča se konstantno mućka 1', a zatim inkubira 3^h na 4°C, pri čemu dolazi do imunološke reakcije između antigena i antitela. Nakon toga, ploča se opet ispire puferom 2, a zatim se dodaje 200 µl alkalnom fosfatazom obeleženog sekundarnog antitela, anti-mišijeg IgG-a, rastvorenog u puferu 1

(TRIZMA, MgCl i NaCl rastvoreni u H₂O, pH 7,8). Ponovnom inkubacijom na 37°C u trajanju od 1^h dolazi do vezivanja sekundarnog antitela za primarno antitelo. Nakon ispiranja ploče puferom 2, u otvore se otpipetira 200 µl p -nitrofenil fosfata (supstrat), rastvoren u natrijum-hidrogen-karbonatnom rastvoru (NaHCO₃, pH 9,6). Supstrat reaguje sa sekundarnim antitelom pri čemu dolazi do bojenja rastvora. Ploča se zatim inkubira na 37°C sve dok B+ kontrola ne dostigne vrednosti apsorbance bliske 1, što se očitava na 405 nm na ELISA čitaču (Tecan, Sunrise). Intenzitet obojenja je obrnuto proporcionalan količini antigena (ABA).

Za proračun rezultata korišćen je program napravljen u Excel-u (www.asch-online.eu/downloads/hormones/ABA-Standard.xls)

Određivanje enzimске aktivnosti peroksidaze

Određivanje aktivnosti enzima jonski vezane peroksidaze obavljeno je gvajakol-testom (Chance i Maehly, 1955). Za merenje aktivnosti jonski vezane peroksidaze ćelijskog zida korišćeni su plodovi paradajza u sledećim fazama razvića: 15., 20., 30. i 45. dana posle antezisa (dpa) i u fazi biološke zrelosti. Uzorci egzokarpa su uzimani sa ekvatorijalnog dela ploda (Thompson *i sar.*, 1998), zamrzavani u tečnom azotu i skladišteni na -80°C do početka analize.

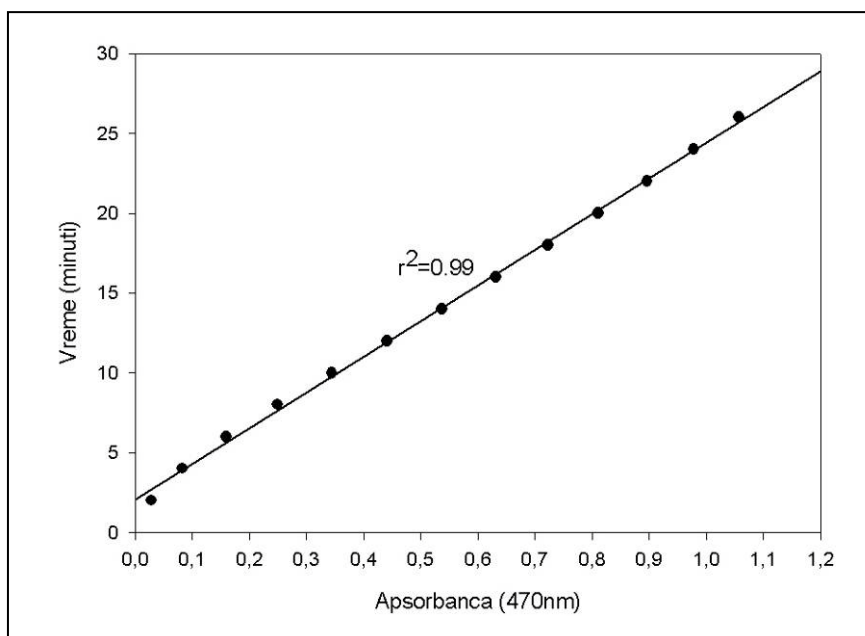
Ekstrakcija enzima

Ekstrakcija peroksidaze ćelijskog zida je urađena tako što je 0,5 g egzokarpa ploda paradajza homogenizovano u zaleđenom avanu uz dodatak kvarcnog peska i 50 mM fosfatnog pufera pH 7,5 u odnosu 1:10. Homogenat je centrifugiran 5 minuta na 2500 obr/min (Sigma 2-16K, Germany) i supernatant je odbačen. Ovaj postupak je ponovljen ukupno osam puta. Nakon drugog centrifugiranja, talog je resuspendovan uz dodatak Triton X-100. Posle poslednjeg centrifugiranja dobijeni talog je resuspendovan u fosfatnom puferu pH 7,5 uz dodatak 1M NaCl (u odnosu 1:10). Resuspenzija je inkubirana 60 minuta na ledu, a posle toga je centrifugirana 10 minuta na 10000 obr/min. Supernatant, sakupljen posle centrifugiranja, sadržao je jonski vezanu frakciju peroksidaze ćelijskog zida.

Merenje aktivnosti enzima

Metoda za određivanje aktivnosti peroksidaze zasniva se na spektrofotometrijskom merenju žutog obojenja koje potiče od tetragvajakola, koji nastaje kao proizvod reakcije između gvajakola (H-akceptor) i H_2O_2 (H-donor) pod dejstvom peroksidaze. Pošto je pH 5,5 optimalna vrednost za aktivnost peroksidaze (Bacon *i sar.*, 1997b), pH svih rastvora korišćenih za određivanje aktivnosti podešavana je na tu vrednost. Aktivnost peroksidaze je određivana po modifikovanoj metodi (Chance i Maehly, 1955). U otvore mikro-titar ploče je odmereno 200 μl fosfatnog pufera sa gvajakolom, 19 μl 20 mM fosfatnog pufera, pH 5,5, 1 μl uzorka i 40 μl 0.03% H_2O_2 . Mikro-titar ploče su zatim temperirane na 25°C u inkubatoru (Heraeus, Thermo Scientific). Reakcija je trajala 10 minuta od momenta dodavanja H_2O_2 u uzorke, a zatim je merena apsorbanca na ELISA spektrofotometru (Tecan, Sunrise) na talasnoj dužini od 470 nm.

Za dobijanje standardne krive (Sl. 11) izvršena je priprema na prethodno opisan način, s tim što je umesto uzorka korišćen rastvor peroksidaze rena (eng. horseradish) sa aktivnošću 0.004 IU. Praćena je promena apsorbanca na 470 nm, na 25°C, na svaka 2 min. u toku 20 minuta.



Slika 11. Kalibraciona kriva za određivanje aktivnosti peroksidaze iz egzokarpa ploda paradajza.

Izmerena aktivnost izolovane peroksidaze iz egzokarpa plodova paradajza uz pomoć jednačine krive izračunata je i izražena u horseradish peroksidaza ekvivalentnim jedinicama (HRPEU) po g sveže mase uzorka uzetog za analizu:

$$HRPEU = \frac{0.004 \cdot y}{10 \text{ min}}$$
$$y = 22.38 \cdot A_{470nm} + 2.05$$

Proteomik analiza plodova

Proteomik analiza je imala za cilj da identifikuje i kvantitativno analizira proteine u plodovima ispitivanih biljaka. Plodovi paradajza, koji su korišćeni za analizu proteina, su sakupljeni sa prvih pet cvetnih grana svake biljke. Analizirani su plodovi izdvojeni sa biljaka iz dva tretmana (DSK i ON - kao kontrola), i to u 15. i 30. danu posle antezisa (dpa). U 15. dpa fazi razvića kod ploda ćelije paradajza imaju ubrzan porast. Faza 30. dpa se posmatra kao faza koja prethodi početku sazrevanja plodova. Izolovani perikarp, minimalno od 15 plodova paradajza, je zamrzavan u tečnom azotu i skladišten na -80°C do početka analize.

Ekstrakcija proteina

Za ekstrakciju proteina odmereno je 2,5 g perikarpa paradajza samlevenog u analitičkom mlinu (A-11 basic, IKA), koji je prethodno ohlađen u tečnom azotu. Za svaki uzorak, rađene su po četiri nezavisne ekstrakcije (četiri ponavljanja). Ekstrakcija proteina je rađena po metodi Mihr i Braun (2003), koju su modifikovali Faurobert *i sar.* (2007a). Uzorci su suspendovani u 7,5 ml ekstrakcionog pufera (koji sadrži 700 mM saharozu, 500 mM Tris, pH 8, 100 mM KCl, 2% [v/v] β-merkaptetoetanol, 2 mM fenil-metilsulfonil fluorid, pH 8,5) i inkubirani 10 min. na ledu. Potom je dodato 7,5 ml Tris-saturisanog fenola (pH 7,9) i ostavljeno na mućkalici 10 min. na sobnoj temperaturi. Da bi se odvojila fenolna faza od vodene, tube sa uzorcima su centrifugirane 15 min. na 4°C, 5525 g (Sigma 4K15C, Germany). Fenolna faza je zatim ispirana sa 7,5 ml ekstrakcionog pufera (vortex, IKA, Germany), pa centrifugirana (12 min., 4°C, 5525 g). Fenolna faza je pažljivo odvojena i u nju je dodato 5 zapremina precipitacionog rastvora (0,1 M amonijum acetat rastvoren u metanolu). Nakon ovog

koraka, uzorak je ostavljen preko noći na -20°C kako bi došlo do taloženja proteina. Posle centrifugiranja (15 min., 4°C, 5525g), supernatant je odbačen, a talog ispran 3 puta sa 5 ml rastvora za precipitaciju, a poslednji put acetonom. Posle svakog ispiranja uzorak je centrifugiran 5 min., na 4°C i 5525 g. Preostala količina acetona je odstranjena uparavanjem na sobnoj temperaturi. Talog je zatim resuspendovan u Lysis puferu (9 M urea, 4% [w/v] CHAPS, 0,5% [v/v] Triton X-100, 20 mM DTT, 1,2% [v/v] formalit, pH 3-10) mućkanjem 2^h na sobnoj temperaturi, a zatim je supernatant, koji predstavlja proteinski uzorak, pažljivo sakupljen i do početka analize čuvan na -20°C.

Merenje koncentracije proteina

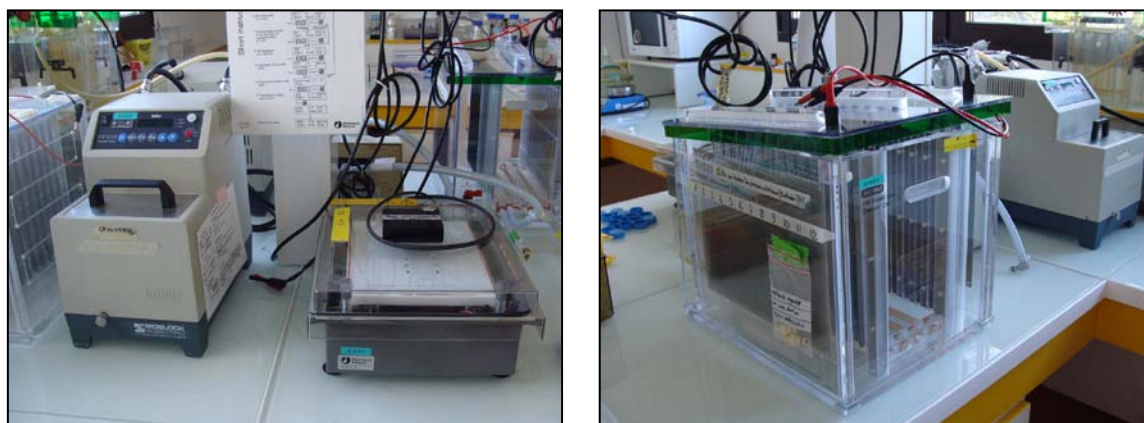
Pre početka analize izmerena je koncentracija proteina u uzorcima, metodom po Bratford-u (Ramagli i Rodriguez, 1985). Po protokolu, 10 µl uzorka se pomeša sa 90 µl miliQ vode (zakišeljene sa 0,1 N HCl) i 3,5 ml boje (Dye Reagent Concentrate, BioRad Protein Assay), promućka na vorteksu, pa inkubira 5 min. na sobnoj temperaturi i nakon toga se na 595 nm očitavaju vrednosti apsorbance. Za određivanje koncentracije proteina u uzorku, pravi se standardna kriva sa poznatim koncentracijama ovalbumina razblaženim u Lysis puferu (µg/µl).

Analiza 2-D elektroforezom

Tehnika dvodimenzionalne elektroforeze služi za razdvajanje proteina iz smeše na osnovu dve fizičko-hemijske osobine molekula, i to: naelektrisanja i veličine. U prvoj dimenziji - izoelektričnom fokusiranju, dolazi do razdvajanja proteina na osnovu njihove izoelektrične tačke (pI), u prisustvu amfolita koji obezbeđuju konstantan pH gradijent. U drugoj dimenziji - vertikalna elektroforeza, u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) dolazi do razdvajanja proteina na osnovu veličine molekula. Između dve dimenzije neophodno je sprovesti korak ekvibracije. „Immobiline dry strips“ gel trake (stripovi) se inkubiraju nekoliko minuta na sobnoj temperaturi u puferu za ekvibraciju. Svrha ekvibracije je da omogući proteinima u gelu da u potpunosti reaguju sa SDS-om, kako bi pravilno migrirali u drugoj dimenziji.

Sama procedura 2-D elektroforeze se sastojala iz niza koraka. Pre početka izoelektričnog fokusiranja urađena je pasivna rehidracija stripova. Korišćeni su 24 cm dugački stripovi, pH 4-7 (Amersham Biosciences) na koje je naneto: 500 µg

resuspendovanih proteina, 9 μ l amfolita pH 4-7 i pufer za rehidraciju (8 M urea, 2% [w/v] CHAPS, 0,3% [w/v] DTT, 2% [v/v] formalit, pH 3-10) do konačne zapremine 450 μ l. Rehidracija stripova je trajala 16^h. Izoelektrično fokusiranje je urađeno na aparatu Multiphor II (Pharmacia Biotech) (Sl. 12) po sledećem programu: 2^h na 150V, 2^h na 400V; 2^h je rasla voltaža sa 400 do 3500V i 18^h na 3500V. Nakon migracije proteina, stripovi su inkubirani u puferu za ekvibraciju (6 M urea, 50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 30% glicerol, 2% [w/v] SDS sa dodatkom 2% [w/v] DTT u prvom ekvibracionom koraku i 2,5% [w/v] jodacetamidom u drugom ekvibracionom koraku, u trajanju od po 20 min. Druga dimenzija - SDS PAGE je rađena na 13% akrilamidnom gelu u kadama za elektroforezu (Protean plus, Dodeca Cell, Bio-Rad) (Sl. 14) po sledećem programu: 45 min. na 80V, 15^h na 120V. Nakon razdvajanja proteina na osnovu veličine molekula, gelovi su obojeni (četiri gela po uzorku) bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 (Neuhoff *i sar.*, 1988).



Slika 12. Aparati za izoelektrično fokusiranje (levo) i vertikalnu elektroforezu (desno).

Za poređenje gelova, kako bi se detektovali i kvantifikovali proteini koji se statistički značajno razlikuju između posmatranih tretmana, faza razvića ploda i genotipova, korišćen je Progenesis SameSpot softver verzija 3.0.

Identifikacija proteina

Prvo je izvršena selekcija gelova, jer su od ukupno izdvojenih 1679 proteina, 52 proteina pokazala značajna variranja kako u odnosu na mesto razdvajanja na gelu tako i po intenzitetu obojenja tačaka između gelova. One tačke koje su sadržale proteine su

isečene sa gela i razložene tripsinom - 5^h sa 125 ng tripsina (Promega) rastvorenom u 20 mM amonijum-bikarbonatu i 20% [v/v] metanolu. Dobijeni peptidi su zatim ekstrahovani 2 puta sa po 30 µl 5% [v/v] trifluoroacetne kiseline i 50% [v/v] acetonitrilom. Fragmenti gela koji su sadržali peptide su nakon toga sušeni u vakuum centrifugi, a zatim resuspendovani u 15 µl smeše 0,08% [v/v] trifluoroacetne kiseline, 0,02% [v/v] n-heptafluorobuterne kiseline i 3% [v/v] acetonitrila. Tripsinski peptidi su dalje analizirani metodom tečne hromatografije - masene spektrometrije (LC-MS/MS) (Faurobert *i sar.*, 2007b).

Metoda tečne hromatografije visokog stepena razdvajanja (HPLC) je rađena pomoću Ultimate LC sistema u kombinaciji sa Famos autosampler-om i Switchos II microcolumn switching (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA). LCQ Deca XP (Thermo Electron) je korišćen za nano-elektro sprej jonizaciju. Peptidni joni su analizirani N-zavisnom metodom na sledeći način: (1) MS scan (odnos mase prema naelektrisanju 400-1900), (2) ZoomScan (skan dva glavna jona pri višoj rezoluciji) i (3) MS/MS ova dva jona ($Q_z = 0,22$, aktivaciono vreme 50 ms, energija kolizije 40%). Identifikacija je urađena pomoću Xtandem softvera. Glavni traženi parametri su bili izdvojeni primenom tripsina, i to: karboksiamidometilovani cisteinski i oksidovani metionininski ostaci aminokiselina kao i acetilovani i deamidovani N-terminalni delovi proteina. Za ispitivanje je korišćena SGN baza podataka (EST baza podataka db65, verzija 20100114, ftp://ftp.sgn.cornell.edu/unigene_builds/, 42257 sekvenci), koja je prevedena na šest frejmova za čitanje. Identifikacija proteina je smatrana statistički značajnom kada je protein sadržao najmanje tri različita peptida, pri čemu je praćen i odnos njihove ukrštene korelacije (Xcorr), u poredjenju sa veličinama 1.7, 2.2, i 3.3 za mono-, di-, i tri-naelektrisanja peptida. Za identifikaciju su minimalno korišćena dva različita peptida. U slučajevima kada su identifikovane samo dve ili tri MS/MS vrednosti, sličnost između eksperimentalne i teorijske MS/MS vrednosti je bila vizuelno potvrđena. U nekoliko slučajeva, proteini su identifikovani poređenjem sa proteinskim sekvencama *Arabidopsis* u okviru baze Information Resource. Anotacija proteina je izvršena pomoću Sol Genomics Network (SGN) tomato unigene baze podataka.

4.4. Statistička obrada podataka

Za analizu fizioloških parametara korišćen je statistički program SigmaPlot (verzija 11.0) korišćenjem Studentovog *t*-testa, sa nivoom značajnosti manjim od 0.05. Za potrebe kvantifikacije proteina korišćen je Progenesis SameSpot softver verzija 3.0, uz pomoć koga je određena i razlika između proteina na različitim gelovima, korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) na osnovu podataka normalizovane zapremine tačaka na gelovima, sa vrednostima $p < 0.01$ i $q < 0.015$. Za potrebe poređenja ispitivanih genotipova, tretmana i faza razvića plodova, urađena je multifaktorijalna analiza varijanse (ANOVA), sa nivoima značajnosti od $*p < 0.01$, $**p < 0.001$ i $***p < 0.0001$), u statističkom programu R verzija 2.11.1 (The R Project for Statistical Computing; <http://www.r-project.org/>).

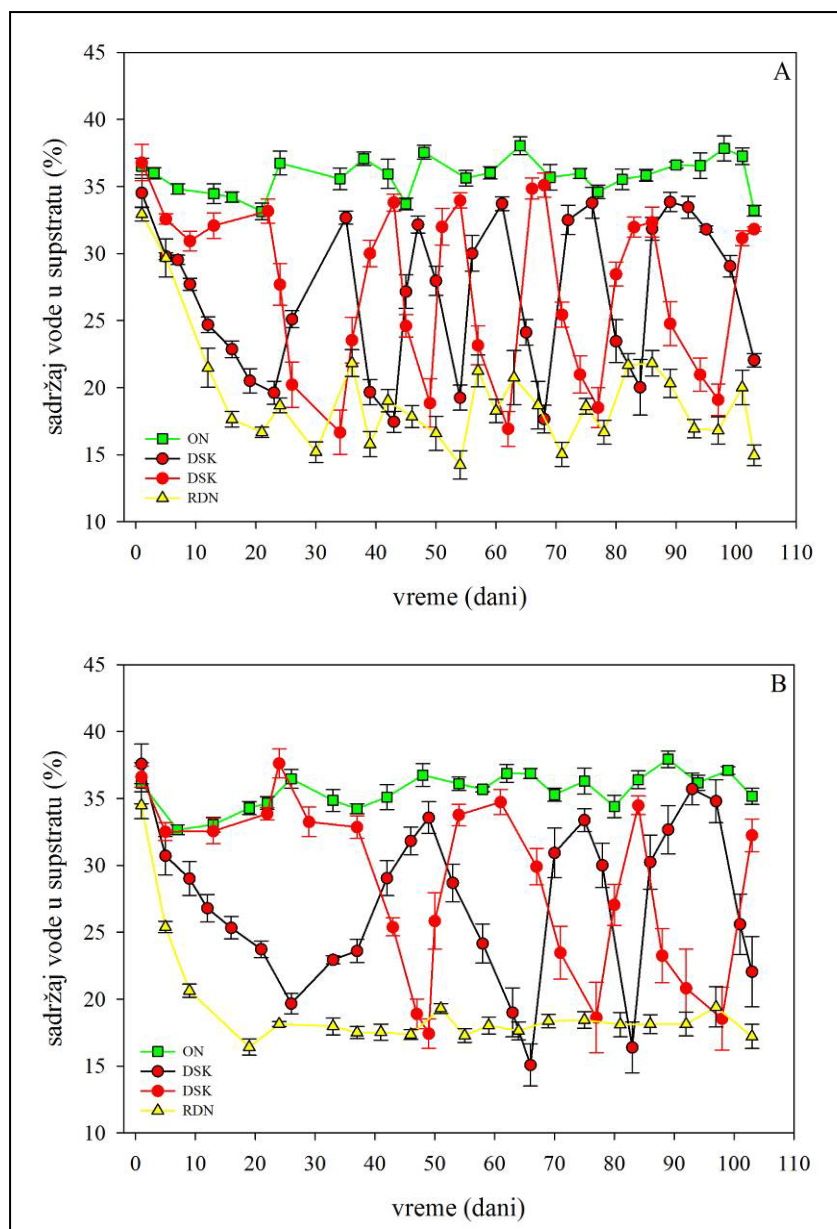
5. REZULTATI

5.1. Fiziološka istraživanja

5.1.1. Sadržaj vode u supstratu

Vrednosti dinamike promene sadržaja vode u supstratu kod genotipa Ailsa Craig i mutanta *flacca* prikazane su na Sl. 13. Kod oba genotipa, prosečan sadržaj vode optimalno navodnjavanih (ON) biljaka je iznosio oko 35-36%. U tretmanu regulisanog deficita navodnjavanja (RDN), sadržaj vode u toku eksperimenta je održavan na 18-20%, što predstavlja oko 50% manju količinu vode u supstratu u odnosu na ON biljke. U tretmanu delimičnog isušivanja korenova (DSK) navodnjavana strana korena je u proseku dostizala zapreminski sadržaj vode u supstratu od oko 33-34%, što je za oko 10% manje vode u odnosu na optimalni vodni kapacitet. U DSK tretmanu, za navodnjavanu stranu korena korišćeno je oko 70% vode od količine za ON biljke. Strana korena koja nije navodnjavana je ostavljena da se isuši do zapreminskog sadržaja vode u supstratu od oko 18%, što odgovara količini vode u RDN tretmanu.

Analiza prosečnog vremena koje je potrebno da se izvrši zamena strana navodnjavanja u DSK tretmanu je pokazala da kod Ailsa Craig to vreme je iznosilo oko 8 dana (Sl. 13A). Kod mutanta *flacca*, u proseku, potrebno je bilo 12 dana da se sadržaj vode u strani korena koja nije navodnjavana spusti na 18% (Sl. 13B). Dinamika ove promene u toku ispitivanog perioda je pokazala da je u početku primene DSK tretmana, kod oba genotipa, bilo potrebno više vremena da se sadržaj vode u strani koja nije navodnjavana smanji na 18% i to kod Ailsa Craig 22 dana, a kod *flacca* 26 dana. To je verovatno bila posledica faze razvića u kojoj su se biljke nalazile, jer je u ranijim fazama razvića biljaka koren bio manje razvijen, a i njihove potrebe za vodom su bile manje. U kasnijim fazama razvića, ovaj period se skratio, pa je kod Ailsa Craig najkraći bio između 35. i 70. dana i u proseku trajao 6 dana, dok je kod *flacca* mutanta period intenzivnog usvajanja vode bio između 65. i 85. dana od početka primene tretmana i u proseku je trajao 9 dana. Sporije opadanje sadržaja vode u zemljištu na strani korena koja nije zalivana kod *flacca* mutanta (Sl. 13B), je verovatno bio posledica manjeg utroška i slabijeg usvajanja vode kod ovih biljaka u odnosu na Ailsa Craig (Sl. 13A).



Slika 13. Sadržaj vode u supstratu za različite tretmane (ON, DSK i RDN) u toku eksperimentalnog perioda kod genotipa Ailsa Craig (A) i flacca mutanta (B).

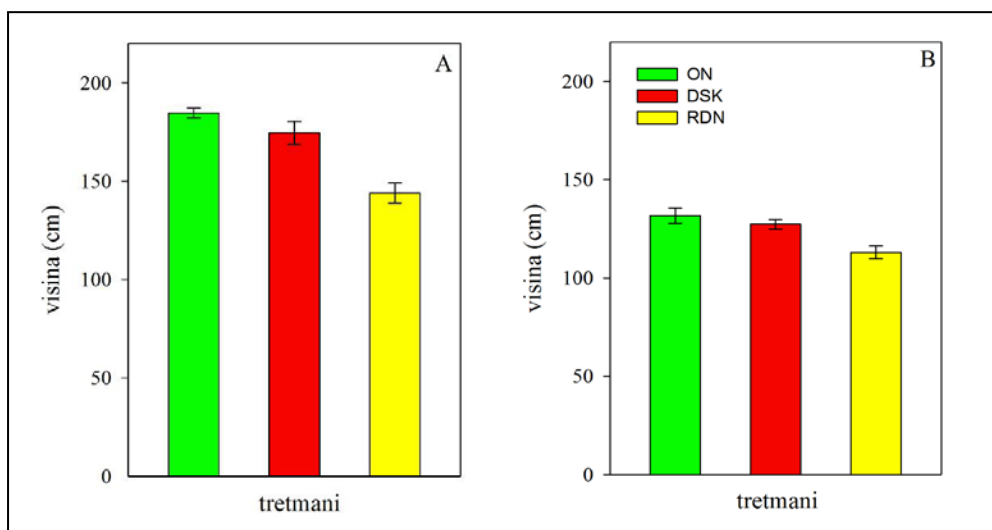
5.1.2. Rastenje i razviće biljaka

5.1.2.1. Visina biljaka

Prosečna visina biljaka na kraju ogleda kod Ailsa Craig i mutanta *flacca* prikazana je na Sl. 14. Ovi rezultati pokazuju da su kod oba genotipa najveću visinu imale biljke u tretmanu ON, zatim u DSK, pa u RDN. Kod genotipa Ailsa Craig prosečna visina biljaka u tretmanu je iznosila 185 cm, a u DSK 175 cm, što je za 5% manje od kontrole (Sl. 14A). Međutim, t-testom nije utvrđena statistički značajna razlika u visini biljaka između tretmana ON i DSK. Prosečna visina biljaka u tretmanu RDN je iznosila 144 cm, što je za 22% manje u odnosu na ON. Statistički značajna razlika je utvrđena između tretmana ON i RDN ($p < 0,01$), kao i između DSK i RDN ($p < 0,05$).

Kod mutanta *flacca* vrednosti prosečne visine biljaka u ON, DSK i RDN tretmanima su iznosile 132 cm, 127 cm i 113 cm (Sl. 14B). Biljke u tretmanu DSK su bile za 4% niže, a u RDN za 14% niže od ON. Statistički značajna razlika je utvrđena između ON i RDN ($p < 0,05$) i DSK i RDN ($p < 0,05$). Između tretmana ON i DSK, t-testom nije utvrđena statistički značajna razlika.

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su na visinu biljaka značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,05$).



Slika 14. Uticaj ispitivanih tretmana (ON, DSK i RDN) na visinu biljaka Ailsa Craig (A) i *flacca* mutanta (B).

5.1.2.2. *Biomasa i njena distribucija*

U okviru ispitivanja efekata tretmana navodnjavanja na rastenje biljaka praćena je ukupna biomasa biljaka i njena distribucija po pojedinim vegetativnim organima (koren, stablo i listovi) i u plodovima.

Rezultati ovih ispitivanja su pokazali, a što je i za očekivati, da je ukupna i sveža i suva masa bila značajno veća kod Ailsa Craig u odnosu na svežu i suhu masu kod *flacca* biljaka. Ta se razlika ispoljila i u kontroli i u ispitivanim tretmanima (Sl. 15 i 17).

Uticaj tretmana navodnjavanja (ON, RDN, DSK) na svežu biomasu u različitim organima (listu, stablu, korenovima i plodu) genotipa Ailsa Craig i mutanta *flacca* prikazan je i u Tab. 2. i na Sl. 15.

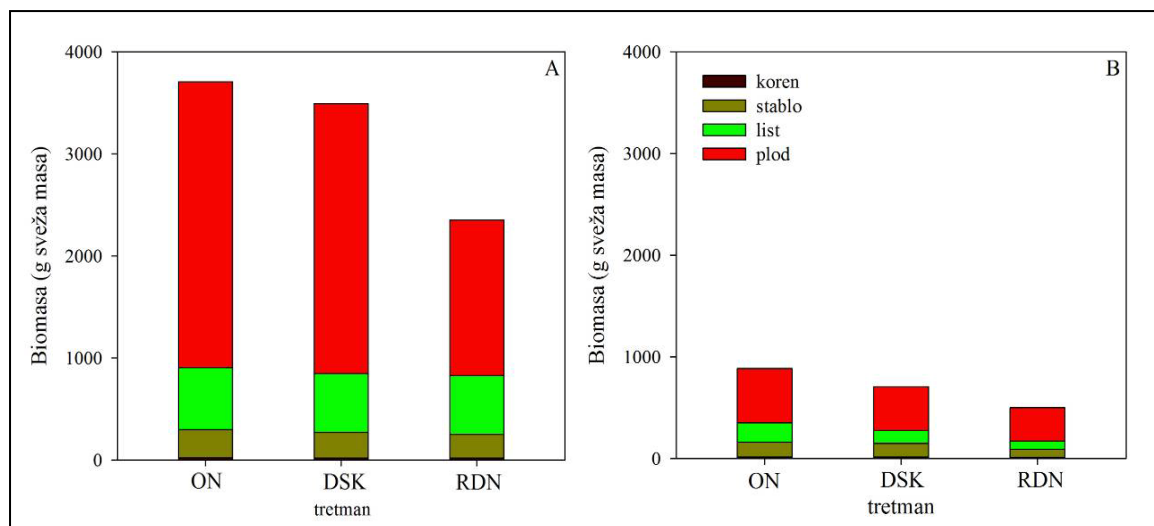
Tabela 2. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na svežu biomasu kod genotipa Ailsa Craig i *flacca* mutanta.

sveža masa genotip /tretman		koren (g/biljci)	stablo (g/biljci)	list (g/biljci)	plod (g/plodu)
Ailsa Craig	ON	20,75±2,91	276,86±8,09	606,76±52,70	50,13±2,84
	DSK	19,98±2,44	250,08±16,22	575,46±43,87	61,84±3,21
	RDN	20,03±2,41	229,86±9,24	578,04±34,25	48,16±2,42
<i>flacca</i>	ON	14,08±2,35	147,20±13,06	188,83±35,81	18,01±1,68
	DSK	16,02±1,80	132,73±2,73	125,70±26,04	16,73±2,68
	RDN	10,53±1,02	80,27±2,41	82,10±2,85	13,66±1,42

Kod genotipa Ailsa Craig različiti tretmani navodnjavanja nisu pokazali statistički značajan uticaj na svežu masu korena. Najveću masu korena imale su biljke u tretmanu ON (20,75 g), zatim u tretmanu RDN (20,03 g), i to za oko 3,5% manju masu u odnosu na ON. Biljke u tretmanu DSK (19,98 g) su imale za oko 3,7% manju svežu masu korena u odnosu na kontrolu. Najveća sveža masa stabla izmerena je kod ON biljaka (276,86 g), zatim kod DSK (250,08 g, za oko 9,7% manja u odnosu na ON), dok je kod RDN biljaka sveža masa stabla bila najmanja (229,86 g, za oko 17% manja u odnosu na tretman ON). Statistički značajna razlika kod sveže mase stabla utvrđena je između tretmana ON i RDN ($p < 0,01$). Uticaj tretmana na svežu masu listova nije pokazao statistički značajne razlike. Najveća sveža masa listova izmerena je kod biljaka

u tretmanu ON (606,76 g), zatim u tretmanima RDN (578,04 g, za oko 4,7% manje od ON biljke) i tretmanu DSK (575,46 g, za oko 5,2% manje u odnosu na ON biljke). Što se tiče plodova, najveću prosečnu masu ploda imale su biljke u tretmanu DSK (61,84 g), dok su biljke u tretmanu ON (50,13 g) imale za oko 18,9% manju masu, a biljke u tretmanu RDN (48,16 g, za oko 22,1% manju masu u odnosu na DSK). Statistički značajna razlika utvrđenja je između tretmana ON i DSK ($p<0,05$), ON i RDN ($p<0,01$) i DSK i RDN ($p<0,001$).

Kod mutanta *flacca*, najveća sveža masa korena izmerena je kod biljaka u tretmanu DSK (16,02 g), zatim u tretmanu ON (14,08 g, za oko 12,1% manju) i u tretmanu RDN (10,53 g, za oko 34,3% manju u odnosu na tretman DSK). Ipak, statističkom analizom podataka nije utvrđena značajna razlika kod sveže mase korena, između posmatranih tretmana. Najveća sveža masa stabla utvrđena je kod biljaka u tretmanu ON (147,20 g), dok su biljke u tretmanu DSK imale masu od 132,73 g (za oko 9,8% manju), a biljke u tretmanu RDN od 80,27 g (za oko 45,5% manju svežu masu stabla u odnosu na tretman ON). Statistički značajna razlika je utvrđena između tretmana ON i RDN ($p<0,001$) i DSK i RDN ($p<0,01$). Najveća sveža masa listova izmerena je kod biljaka u ON tretmanu, (188,83 g), dok su u odnosu na te vrednosti biljke u tretmanima DSK imale masu od 125,70 g (za oko 33,4% manju), a u RDN od 82,10 g (za oko 56,5% manju svežu masu listova). Analizom podataka utvrđena je statistički značajna razlika samo između tretmana ON i RDN ($p<0,05$). Najveću masu plodova imale su biljke u tretmanu ON (18,01 g), zatim u tretmanu DSK 16,73 g (za oko 7,1% manju), pa u tretmanu RDN 13,66 g (za oko 24,1% manju u odnosu na ON biljke). Međutim, zbog varijabilnosti rezultata merenja kod mutanta *flacca* uticaj tretmana na svežu masu pojedinačnih plodova nije pokazao statistički značajne razlike.

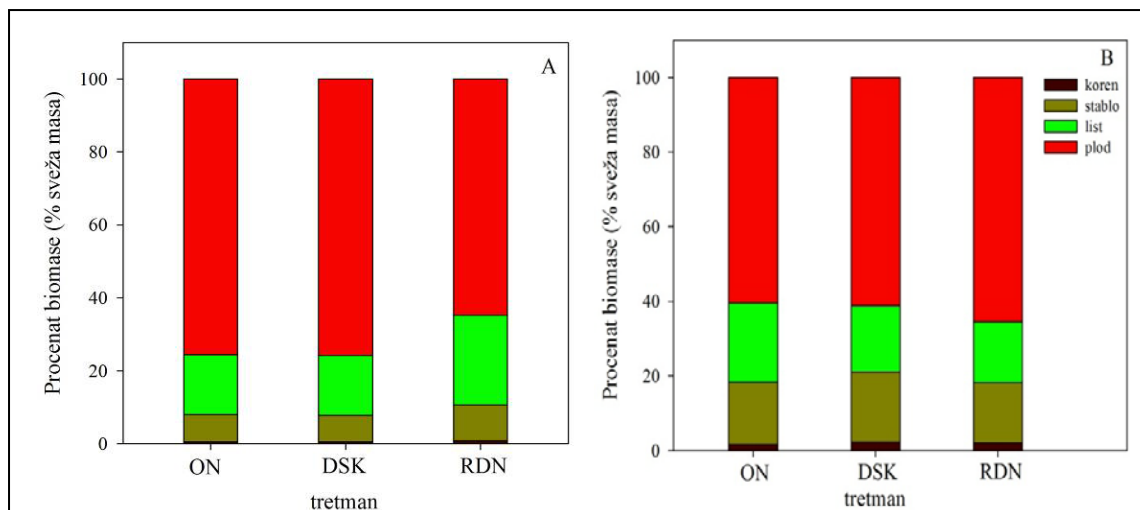


Slika 15. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN svežu biomasu kod genotipa Ailsa Craig (A) i *flacca* mutanta (B).

Da bi se bolje analizirala distribucija biomase u ispitivanim organima ona je predstavljena kao % njihovog učešća u ukupnoj biomasu ispitivanih biljaka (Sl. 16).

Rezultati za Ailsa Craig pokazuju da je distribucija biomase u ukupnoj biomasu biljaka za uslove kontrole bila sledeća: koren – 0,6%, stablo – 7,5%, list 16,4% i plod – 75,6%. U tretmanu DSK biljke su imale sličnu distribuciju biomase: koren – 0,6%, stablo – 7,2%, list – 16,5% i plod – 75,8%. Tretman RDN ukazivao je na malo izmenjenu raspodelu asimilata jer je utvrđena nešto veća akumulacija biomase u vegetativnim organima u odnosu na kontrolne i uslove DSK. U tretmanu RDN distribucija sveže biomase bila je sledeća: koren – 0,8%, stablo – 9,8%, list – 24,6% i plod – 64,8% (Sl. 16A).

Kod *flacca* biljaka u tretmanu ON distribucija biomase bila je sledeća: koren – 1,6%, stablo – 16,6%, list – 21,3%, plod – 60,5% (Sl. 16B). Slične vrednosti su dobijene u tretmanu DSK: koren – 2,3%, stablo – 18,8%, list – 17,8%, plod 61,2%, i nešto izmenjene kod tretmana RDN (koren – 2,1%, stablo – 16%, list – 16,4% i plod 65,5 %).



Slika 16. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na procentualnu zastupljenost sveže biomase u ispitivanim organima kod genotipa Ailsa Craig (A) i *flacca* mutanta (B).

Kod mutanta *flacca* jasno je uočen trend povećanja procentualnog učešća sveže vegetativne biomase u odnosu na biomasu ploda kod svih tretmana u odnosu na Ailsa Craig.

Uticaj tretmana navodnjavanja na distribuciju suve biomase kod genotipova Ailsa Craig i mutanta *flacca* prikazan je u Tab. 3 i na Sl. 17.

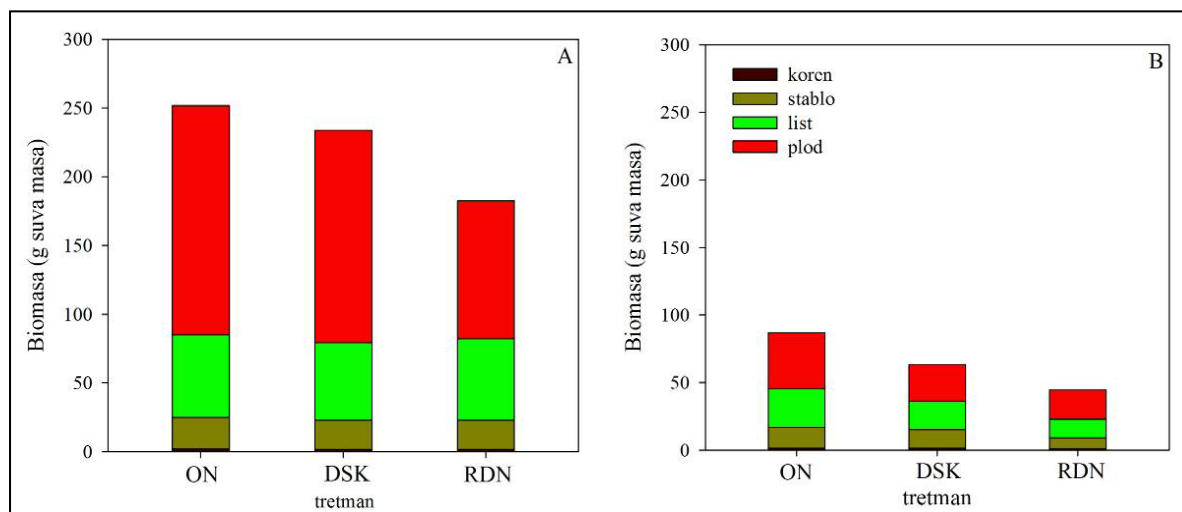
Tabela 3. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na suhu biomasu kod ispitivanih genotipa Ailsa Craig i *flacca* mutanta.

suva masa		koren (g/biljci)	stablo (g/biljci)	list (g/biljci)	plod (g/plodu)
genotip/tretman					
Ailsa Craig	ON	1,92±0,24	22,92±1,41	60,18±5,25	3,47±0,25
	DSK	1,82±0,25	21,04±2,54	56,56±4,43	3,36±0,20
	RDN	1,86±0,23	21,06±0,98	59,18±5,00	2,96±0,14
<i>flacca</i>	ON	1,29±0,24	15,53±0,87	28,53±4,68	1,49±0,29
	DSK	1,31±0,20	13,77±0,98	21,20±3,52	0,95±0,10
	RDN	0,90±0,09	8,20±0,23	13,83±0,61	0,95±0,10

Kod genotipa Ailsa Craig, statističkom analizom podataka utvrđeno je da tretman nije imao uticaja na suhu masu vegetativnih organa. Tako je suva masa korena iznosila: u ON tretmanu 1,92 g, u DSK 1,82 g i RDN 1,86 g. Rezultati za suhu masu stabla su: 22,92 g (ON), 21,04 g (DSK) i 21,06 g (RDN). Za listove vrednosti su: 60,18 g (ON), 56,56 g (DSK) i 59,18 g RDN. Uticaj tretmana je bio izražen samo kod

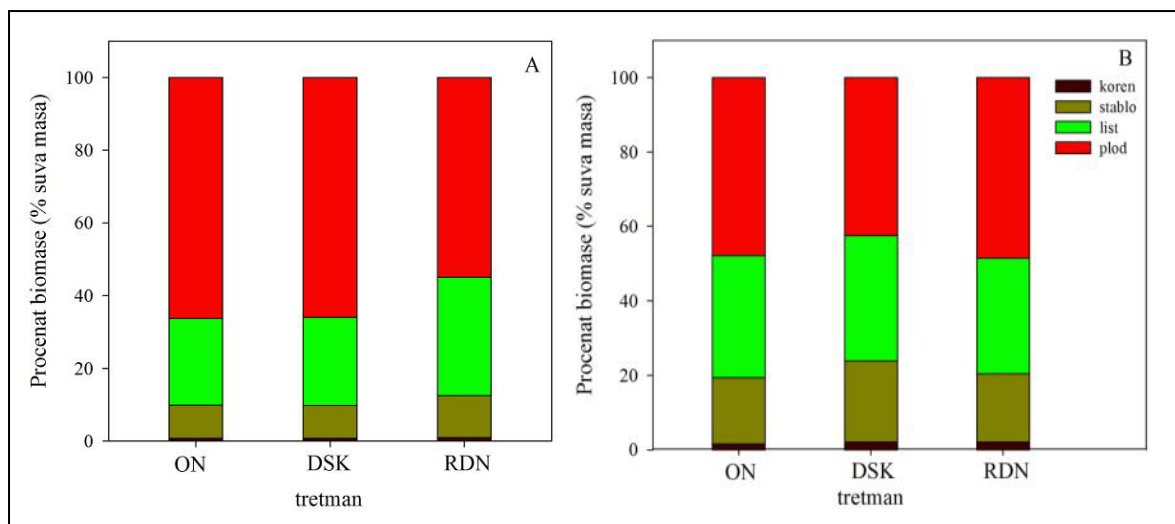
plodova. Značajno smanjenje suve mase u odnosu na ON (3,47 g) i DSK plodove (3,36 g) i to za 14,7% je utvrđeno posle izlaganja biljaka uslovima RDN (2,96 g). Ova razlika je bila statistički značajna ($p < 0,05$).

Kod mutanta *flacca* tretmani navodnjavanja nisu imali uticaj na suhu masu korena. Najveća suva masa stabla izmerena je kod biljaka u uslovima ON (15,53 g), zatim DSK (13,77 g, za oko 11,3% manju u odnosu na ON), a najmanja suva masa kada su bile izložene RDN postupku (8,20 g, za oko 47,2% manju u odnosu na ON). Statistički značajna razlika između suve mase stabla utvrđena je između tretmana ON i RDN, kao i DSK i RDN ($p < 0,01$). Najveću suhu masu listova imale su biljke u tretmanu ON (28,53 g), zatim DSK (21,20 g, za oko 25,7% manju), pa u tretmanu RDN 13,83 g (za oko 51,5% manju). Međutim, statističkom analizom podataka nije utvrđena značajna razlika između tretmana na suhu masu listova, najverovatnije zbog velike varijabilnosti rezultata merenja. Kod pojedinačnih plodova, najveća suva masa ploda utvrđena je kod biljaka u tretmanu ON (1,49 g), dok je u tretmanima DSK (0,95 g) i RDN (0,95 g) suva masa bila za oko 36,2% manja od kontrole, pa je utvrđena statistički značajna razlika između tretmana ON i DSK, kao i ON i RDN ($p < 0,01$).



Slika 17. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN suvu masu korena, stabla, listova i plodova kod genotipa Ailsa Craig (A) i *flacca* mutanta (B).

Rezultati merenja procentualnog učešća suve biomase pojedinačnih vegetativnih organa i plodova u ukupnoj suvoj biomasi biljke prikazani su na Sl. 18.



Slika 18. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na procentualnu zastupljenost suve biomase u ispitivanih organima kod genotipa Ailsa Craig (A) i *flacca* mutanta (B).

Kod genotipa Ailsa Craig, procentualno učešće suve biomase pojedinačnih organa imalo je sličan trend kod tretmana ON i DSK, dok je kod tretmana RDN bilo veće procentualno učešće vegetativnih organa, a manje plodova nego u tretmanima ON i DSK. Distribucija suve biomase bila je sledeća, kod tretmana ON: koren – 0,8%, stablo – 9,1%, list – 23,9%, plod – 66,2%; kod tretmana DSK: koren – 0,8%, stablo – 9%, list – 24,2%, plod – 66% i kod tretmana RDN: koren – 1%, stablo – 11,5%, list – 32,4%, plod – 55% (Sl. 18A).

Kada se izvrši poređenje rezultata za Ailsa Craig i *flacca* uočava se da je kod mutanta *flacca* procentualno učešće suve mase vegetativnih organa u ukupnoj biomasi biljaka bilo veće u odnosu na rezultate za Ailsa Craig. U tretmanu ON, distribucija suve mase po organima je bila sledeća: koren – 1,5%, stablo – 17,9%, list – 32,8%, plod – 47,8%; u tretmanu DSK: koren – 2,1%, stablo – 21,8%, list – 33,6%, plod – 42,5% i u tretmanu RDN: koren – 2%, stablo – 18,4%, list – 31%, plod – 48,5% (Sl. 18B).

Treba takođe istaći da je kod oba genotipa ukupna sveža i suva masa biljaka bila najveća u tretmanu ON, zatim DSK, pa RDN (Sl. 15 i 17). Kod genotipa Ailsa Craig ovakav trend smanjenja ukupne sveže i suve mase biljaka između posmatranih tretmana nije zavisio od sveže i suve mase vegetativnih organa, već isključivo od smanjenja sveže i suve mase plodova. Međutim, kod mutanta *flacca* na smanjenje sveže i suve mase biljaka po tretmanima je uticalo progresivno smanjenje mase i vegetativnih organa, kao i plodova.

Uticaj tretmana navodnjavanja na odnos suve mase izdanka i korena, kod oba genotipa, prikazan je u Tab. 4.

Tabela 4. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na odnos suve mase korena i izdanka.

genotip tretman	Ailsa Craig	<i>flacca</i>
ON	44,32±2,67	35,02±2,57
DSK	44,48±4,13	26,96±1,63
RDN	45,17±4,58	24,81±2,21

Kod genotipa Ailsa Craig nije utvrđen statistički značajan uticaj tretmana navodnjavanja na preraspodelu asimilata između izdanka i korena. Kod mutanta *flacca*, u tretmanu DSK došlo je do smanjenja odnosa između suve mase izdanka i korena za 23%, a u tretman RDN za 29,1% u odnosu na kontrolu. Analizom podataka utvrđeno je da postoji značajna razlika samo između tretmana ON i RDN ($p < 0,05$). Ovakav rezultat ukazuje na to da je kod *flacca* mutanta RDN imao veći uticaj na rastenje korena nego na rastenje izdanka.

Dvofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA) utvrđeno je da na odnos suve mase izdanka i korena utiče genotip ($p < 0,01$), dok tretman i interakcija genotipa i tretmana nije ustanovljena.

Uticaj tretmana navodnjavanja (ON, DSK i RDN) na odnos suve mase plodova i izdanka kod genotipa Ailsa Craig i mutanta *flacca*, prikazan je u Tab. 5. Odnos suve mase plodova i izdanka je pokazatelj koji indirektno ukazuje na to da li je tretman uticao više na rastenje plodova ili izdanka, kao i na kretanje asimilata ka plodovima.

Tabela 5. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na odnos suve mase plodova i izdanka.

genotip tretman	Ailsa Craig	<i>flacca</i>
ON	2,06±0,05	0,91±0,09
DSK	2,28±0,03	1,04±0,14
RDN	1,23±0,08	1,04±0,04

Kod genotipa Ailsa Craig, na kraju eksperimenta, utvrđeno je da je došlo do redukcije odnosa suve mase plodova i izdanka u tretmanu RDN, za 40,3%, dok je u tretmanu DSK, došlo do povećanja odnosa suve mase plodova i izdanka za 10,7%. Statističkom analizom podataka je utvrđena značajna razlika između tretmana ON i DSK, ON i RDN, i DSK i RDN, $p < 0.05$, $p < 0.001$ i $p < 0.01$. Ovakav rezultat ukazuje na to da je tretman RDN značajno uticao na smanjen transport asimilata od stabla i listova ka plodovima, dok je u tretmanu DSK došlo do povećanja transporta asimilata ka plodovima.

Kod *flacca* mutanta, u tretmanima DSK i RDN, došlo je do povećanja odnosa suve mase plodova i izdanka za 14,3%. Ipak, statističkom analizom podataka nije utvrđeno da postoji uticaj tretmana navodnjavanja na odnos suve mase plodova i izdanka, što ukazuje na to da tretman nije imao uticaja na preraspodelu asimilata između nadzemnog dela i plodova.

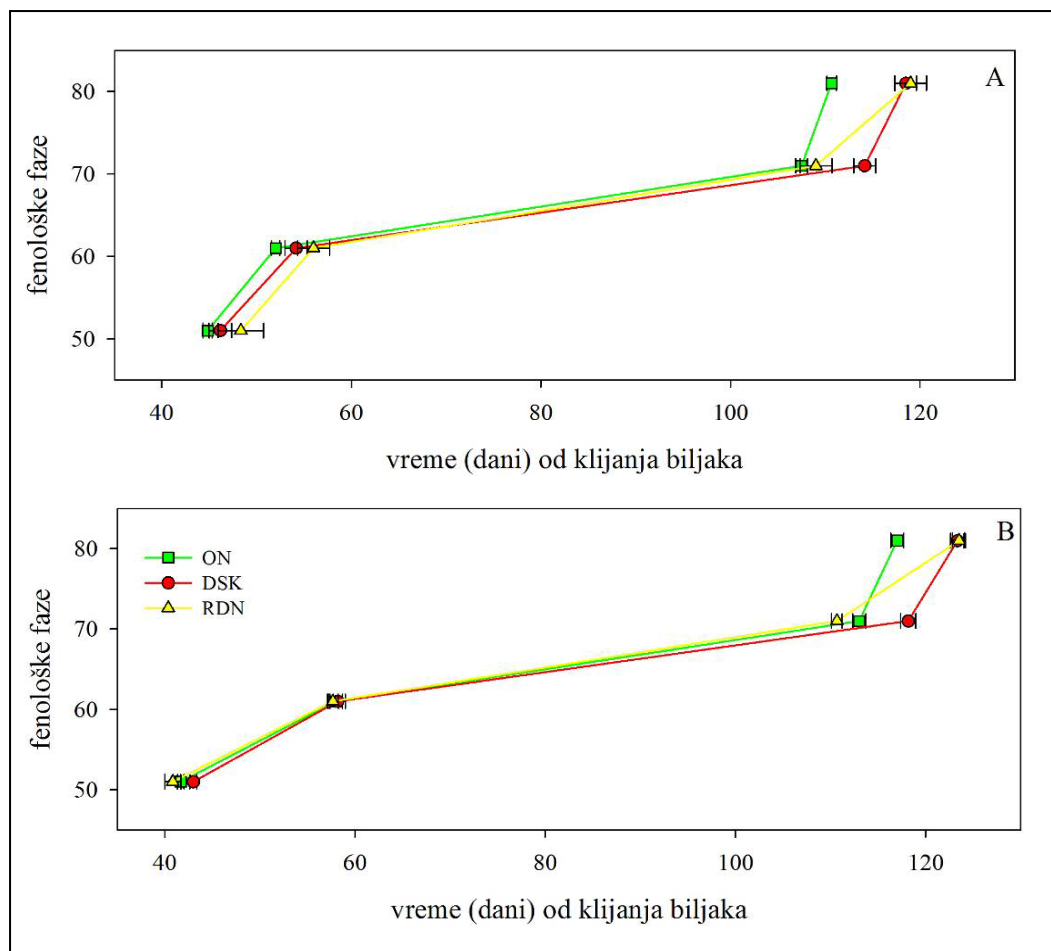
Značajan uticaj na odnos suve mase plodova i izdanka imali su genotip ($p < 0,001$), kao i tretman i interakcija genotipa i tretmana ($p < 0,01$).

5.1.2.3. Fenološke faze

U toku ogleda je praćen i uticaj ispitivanih tretmana na dinamiku odvijanja fenoloških faza u toku razvića biljaka (Sl. 19 i Tab. 6). Fenološke faze su prikazane u formi fenoloških kodova.

Sa primenom tretmana DSK i RDN otpočelo se u fazi kada su biljke imale razvijen 7. list na glavnom stablu (fenološki kod 17). Taj period se kod oba genotipa poklapa sa 30. danom od klijanja biljaka (Sl. 19 A i B).

Kod genotipa Ailsa Craig, prva cvast na glavnom stablu (fenološki kod 51) se pojavila posle 45. dana od klijanja kod tretmana ON, jedan dan kasnije kod DSK, a kod RDN još 2 dana kasnije. U ovoj fazi nije utvrđena statistički značajna razlika između posmatranih tretmana. Treba takođe napomenuti da su biljke u tretmanima ON i DSK prilično ujednačeno ulazile u ovu fazu razvića, dok je kod biljaka RDN utvrđena velika standardna greška, zbog neujednačene pojave prve cvetne grane.



Slika 19. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na fenološke faze razvića genotipa Ailsa Craig (A) i *flacca* mutanta (B).

Tabela 6. Uticaj ispitivanih tretmana na prosečno vreme koje prođe od klijanja biljaka do pojave posmatranih fenoloških faza.

fenološki kod		51	61	71	81
genotip/tretman					
Ailsa Craig	ON	44,83±0,48	52,00±0,45	107,50±0,62	110,67±0,49
	DSK	46,17±1,19	54,17±1,17	114,17±1,17	118,50±1,17
	RDN	48,33±2,39	56,00±1,69	109,00±1,69	119,00±1,69
<i>flacca</i>	ON	41,67±0,33	58,00±0,68	113,00±0,68	117,00±0,68
	DSK	43,00±0,36	58,17±0,79	118,17±0,79	123,33±0,71
	RDN	40,83±0,83	57,67±0,56	110,67±0,56	123,50±0,68

Pojava prvog otvorenog cveta na prvoj cvetnoj grani (fenološki kod 61) se kod tretmana ON ispoljila posle 52 dana od klijanja, kod DSK 2 dana kasnije, a kod RND još kasnije (56. dan). T-testom je utvrđena statistički značajna razlika samo između ON i DSK ($p < 0,05$) i ON i RDN ($p < 0,05$). Između biljaka u DSK i RDN tretmanu nije utvrđena statistički značajna razlika, verovatno zbog neujednačenog razvoja RDN biljaka (Sl. 19A, Tab. 6).

Prvi plod na prvoj cvetnoj grani je dostigao svoj tipičan oblik i veličinu (fenološki kod 71), oko 107. dana od početka klijanja kod ON, 2 dana kasnije kod RDN, i još kasnije u tretmanu DSK (114. dan) kod genotipa Ailsa Craig. Statistički značajna razlika u ovoj fazi, utvrđena je između tretmana ON i DSK ($p < 0,01$) i između DSK i RDN ($p < 0,05$). Plodovi biljaka u tretmanu ON su, kao što se i očekivalo, najbrže sazrevali. Pojava 10% zrelih plodova (fenološki kod 81) se kod ON biljaka javila oko 111. dana od klijanja, a nešto kasnije u tretmanima DSK (118. dan) i RDN (119. dan). Statistički značajna razlika kod genotipa Ailsa Craig utvrđena je između ON i DSK ($p < 0,01$) i ON i RDN ($p < 0,001$).

Kod mutanta *flacca*, prva cvast kod biljaka u tretmanu ON se pojavila oko 42. dana, kod DSK oko 43. dana, a kod RDN oko 41. dana od klijanja (Sl. 19B). Statistički značajna razlika utvrđena je samo između tretmana DSK i RDN ($p < 0,05$). Prvi otvoren cvet na prvoj cvetnoj grani je uočen oko 58. dana od klijanja biljaka kod svih tretmana (Sl. 19B, Tab. 6).

Statistički značajna razlika između posmatranih tretmana je uočena tek u fazi pojave prvog ploda sa karakterističnim oblikom i veličinom i to između ON i DSK ($p < 0,001$), ON i RDN ($p < 0,05$) i DSK i RDN ($p < 0,01$). Prvi plod na prvoj cvetnoj grani sa karakterističnim oblikom i veličinom, se kod mutanta *flacca* javio oko 111. dana od klijanja kod biljaka u RDN tretmanu, 113. dana u ON i oko 118. dana u tretmanu DSK. Pojava 10% zrelih plodova na biljkama prvo je uočena kod biljaka u tretmanu ON oko 117. dana od klijanja. Kod DSK i RDN ova faza se poklapa sa 123. danom od klijanja, pa se statistički značajna razlika javlja samo između tretmana ON i DSK ($p < 0,001$) i ON i RDN ($p < 0,001$).

Dvofaktorijskom analizom varijanse utvrđeno je da na sve posmatrane faze razvika značajno utiče genotip ($p < 0,001$). U poslednje dve posmatrane faze (fenološki

kodovi 71 i 81), pored uticaja genotipa utvrđen je i značajan uticaj tretmana ($p < 0,001$), dok interakcija genotipa i tretmana nije statistički značajna.

U Tab. 7 prikazano je prosečno vreme od pojave prve cvasti do sazrevanja 10% plodova. Kod Ailsa Craig utvrđeno je da se ovo vreme kod DSK i RDN produžava za oko 8% u odnosu na ON. Kod mutanta *flacca*, tretman DSK je produžio vreme sazrevanja plodova za oko 7%, dok je kod tretmana RDN utvrđeno da je ovo vreme duže trajalo (za oko 11%).

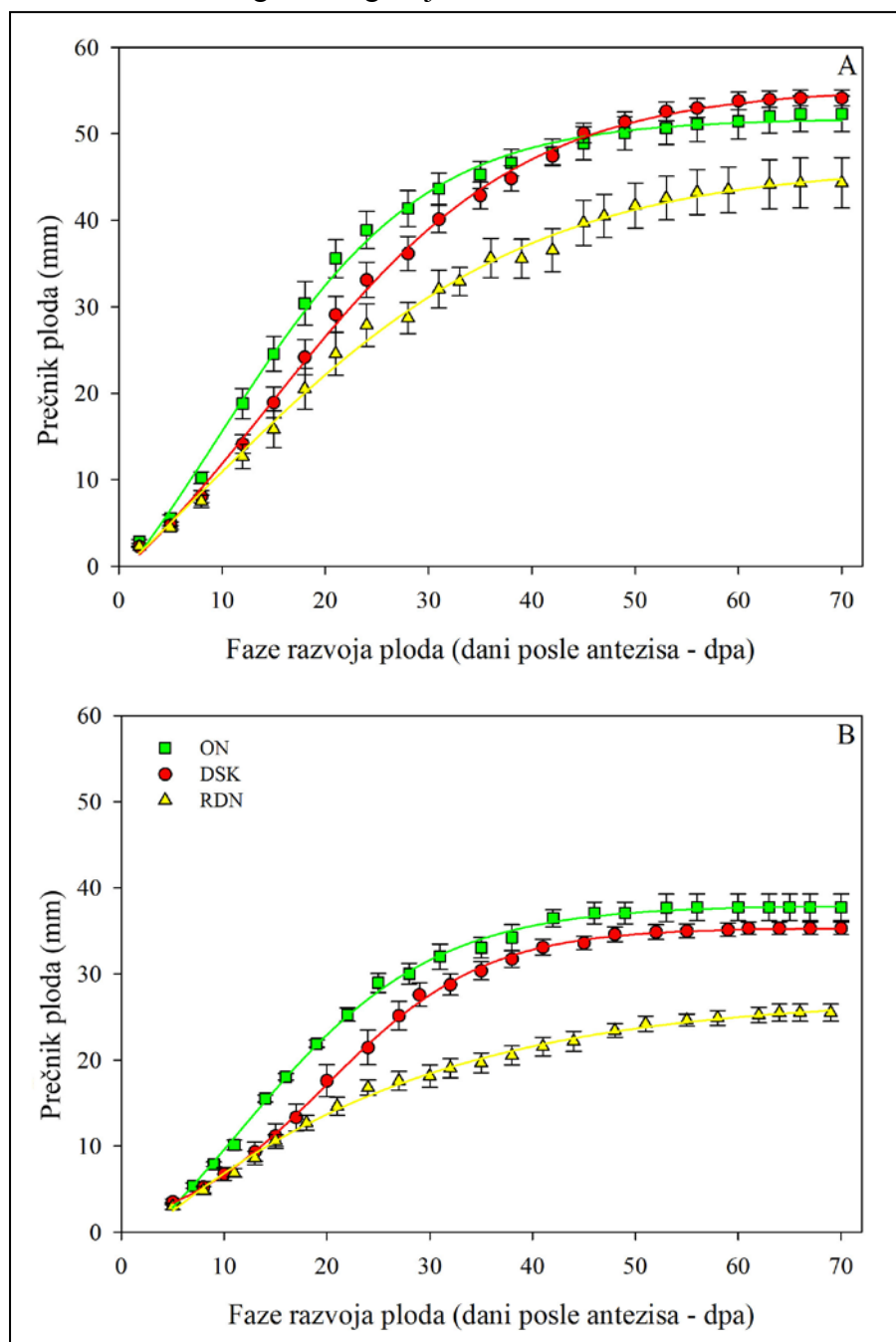
Tabela 7. Uticaj tretmana na prosečno vreme koje prođe od pojave cvasti do sazrevanja 10% plodova.

genotip tretman	Ailsa Craig	<i>flacca</i>
ON	66	75
DSK	71	80
RDN	71	83

Kod oba genotipa, uočeno je da je kod DSK tretmana potrebno duže vremena za početak sazrevanja plodova. Iz toga se može pretpostaviti da primena DSK tretmana najverovatnije utiče na usporeno sazrevanje plodova. Posmatrano na nivou biljke, od pojave prvog zrelog ploda, do pojave 10% zrelih plodova najveći uticaj je imao tretman RDN, kod koga ovaj period traje oko 10 dana kod genotipa Ailsa Craig, odnosno 12 dana kod *flacca*, u odnosu na tretmane ON i RDN kod kojih ovaj period traje 4-5 dana (Sl. 19).

5.1.2.4. Rastenje plodova

Uticaj tretmana navodnjavanja (ON, DSK, RDN) na rastenje plodova, kod genotipa Ailsa Craig i mutanta *flacca*, prikazan je na Sl. 20. Za crtanje krive rastenja korišćen je sigmoidan obrazac četvrtog reda regresije.



Slika 20. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na rastenje plodova kod genotipa Ailsa Craig (A) i *flacca* mutanta (B).

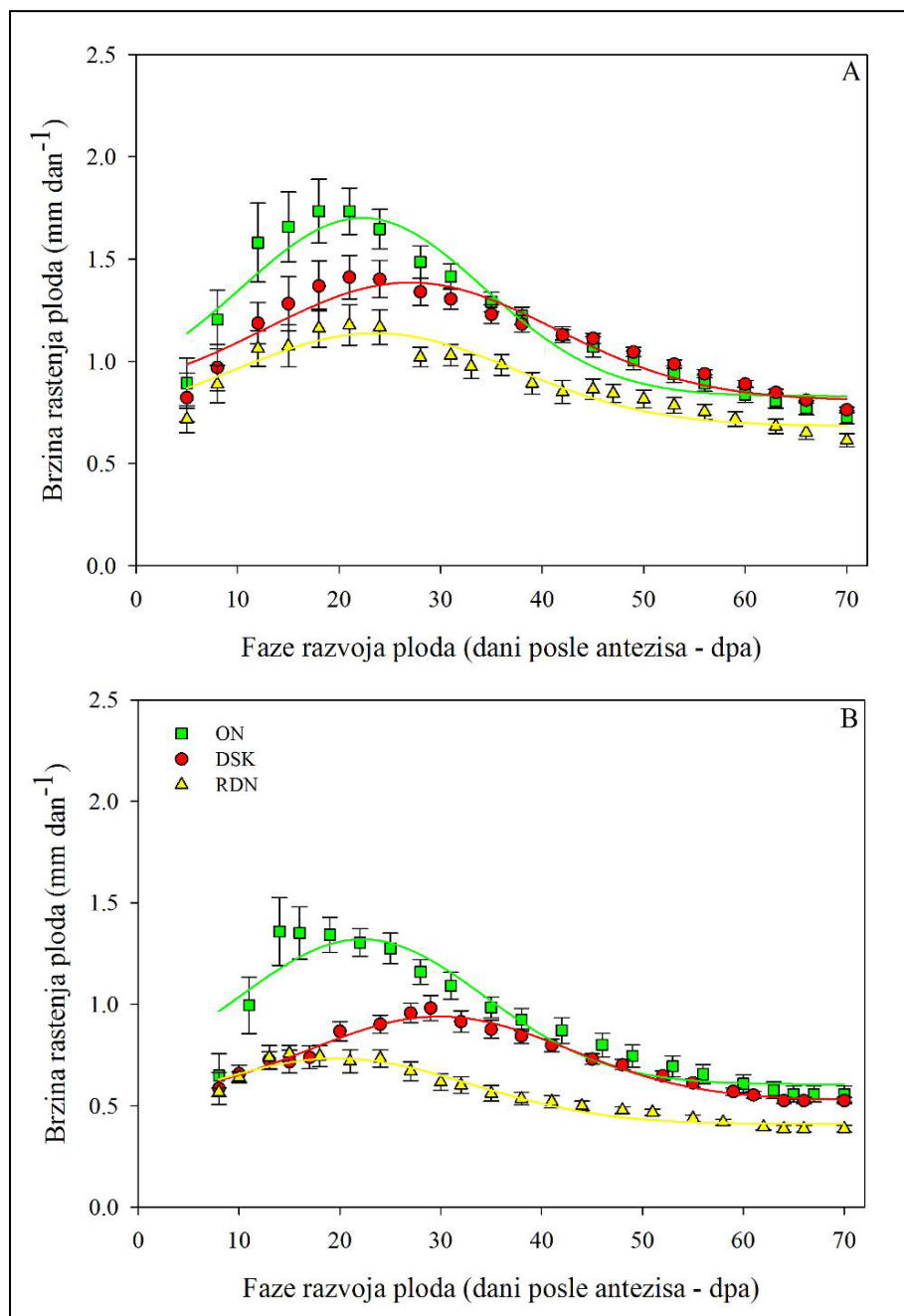
Sigmoidna kriva rastenja može da predstavi oba procesa koja su u osnovi rastenja plodova i to: i deobu i rastenje ćelija (prvenstveno izduživanjem). Međutim, rezultati sigmoidne krive ukazuju samo na odvijanje i brzinu procesa rastenja ćelija, jer nije bilo mogućnosti da se obave merenja u najranijim fazama razvića ploda, a koja su rezultat umnožavanja ćelija u procesu mitotske deobe.

Kod genotipa Ailsa Craig, u sva tri tretmana intenzivan porast plodova počinje između 7. i 10. dana posle antezisa (dpa). U tretmanu ON, plodovi malo ranije prestaju sa intenzivnim porastom u odnosu na DSK i RDN. Kod ON biljaka plodovi usporavaju porast i dostižu svoju konačnu veličinu između 40. i 50. dpa (oko 49,5 mm), dok se kod tretmana RDN i DSK intenzivan porast nastavlja do otprilike 50. dpa i oko 60. dpa kada plodovi dostižu svoju konačnu veličinu od oko 44,3 i 53,8 mm (Sl. 20A).

Kod *flacca* mutanta, u tretmanima ON i RDN intenzivan porast plodova počinje između 7. i 10. dpa, dok je kod tretmana DSK period intenzivnog porasta plodova pomeren za oko nedelju dana i počinje između 15. i 17. dpa. Usporavanje intenzivnog rastenja plodova se u tretmanima ON i DSK dešava između 40. i 45. dpa i plodovi dostižu svoju konačnu veličinu od oko 37,7 i 35,3 mm, a u tretmanu RDN između 30. i 40. dpa, kada je konačna veličina plodova od oko 25,5 mm (Sl. 20B).

5.1.2.5. Dinamika rastenja

Uticaj različitih tretmana navodnjavanja na brzinu rastenja plodova kod genotipa Ailsa Craig i mutanta *flacca* prikazan je na Sl. 21. Za crtanje krive dinamike rastenja plodova korišćena je Gausova, pik kriva, sa četiri parametra.



Slika 21. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na brzinu rastenja plodova kod genotipa Ailsa Craig (A) i *flacca* mutanta (B).

Kod genotipa Ailsa Craig, biljke u tretmanu ON dostigle su maksimalnu brzinu rastenja plodova 18-og dana od pojave plodova, koja je iznosila 1,7 mm po danu. Kod tretmana DSK i RDN, biljke su imale najveću brzinu porasta plodova 21. dana od formiranja ploda, koja je iznosila 1,4 mm po danu i 1,2 mm po danu. Kod biljaka u tretmanu ON period intenzivnog rastenja plodova (više od 1,5 mm po danu), trajao je oko dve nedelje (od 14. do 28. dana od pojave plodova). Kod DSK biljaka period intenzivnog rastenja plodova (preko 1,2 mm po danu), trajao je za oko nedelju i po dana duže u odnosu na tretman ON (od 14. do 38. dana od pojave plodova). Kao posledica produženog perioda intenzivnog porasta plodova u DSK tretmanu, u odnosu na ON, na kraju eksperimenta u DSK tretmanu obrazovali su se plodovi nešto većeg prečnika. Međutim, te razlike u prečniku nisu bile statistički značajne. U tretmanu RDN, period intenzivnog rastenja plodova (preko 1 mm po danu), trajao je oko dve nedelje (od 14. do 28. dana od pojave plodova), slično kao kod kontrolnih biljaka. Manja brzina rastenja plodova kod ovih biljaka je uslovlila i da je njihova konačna veličina bila manja u odnosu na ON i DSK plodove (Sl. 21A).

Kod mutanta *flacca*, u tretmanima ON i RDN biljke su dostigle maksimalnu brzinu rastenja plodova 14. dana od formiranja plodova, koja je iznosila 1,3 mm po danu (ON biljke) i 0,7 mm po danu (RDN biljke). U tretmanu DSK, maksimalna brzina rastenja biljaka je bila 29. dana od formiranja plodova i iznosila je 1 mm po danu. Period intenzivnog rastenja plodova, preko 1,1 mm po danu kod tretmana ON trajao je oko dve nedelje (od 13. do 28. dana od pojave plodova). U tretmanu DSK period rastenja plodova preko 0,8 mm po danu trajao je od 19. do 38. dana od formiranja plodova (19 dana). Kod biljaka u tretmanu RDN period maksimalne brzine rastenja plodova traje znatno kraće u odnosu na ON biljke i biljke u tretmanu DSK. U tretmanu RDN biljke rastu preko 0,7 mm po danu od 12. do 24. dana (12 dana). Kao rezultat kraćeg perioda rastenja plodova u tretmanu RDN biljke na kraju eksperimenta imaju manje prečnike plodova u odnosu na one u tretmanima ON i DSK (Sl. 21B).

5.1.2.6. *Biomasa plodova*

Uticaj posmatranih tretmana navodnjavanja (ON, DSK, RDN) na konačan broj, prečnik, svežu i suhu masu plodova i efikasnost korišćenja vode, kod genotipa Ailsa Craig i mutanta *flacca*, prikazan je u Tab. 8.

Tabela 8. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na ispitivane parametre plodova kod genotipa Ailsa Craig i mutanta *flacca*

genotip/tretman		broj plodova/biljci (g)	prečnik plodova/biljci (cm)	sveža masa plodova/biljci (g)	sua masa plodova/biljci (g)	WUE (g sveže mase/l)
Ailsa Craig	ON	43,33±2,01	49,50±0,79	2180,46±111,17	149,37±11,02	1,75±0,07
	DSK	34,33±1,71	53,78±1,42	2129,96±128,71	125,56±6,72	2,96±0,24
	RDN	32,67±1,23	44,33±2,90	1523,99±93,06	100,26±3,70	3,04±0,23
<i>flacca</i>	ON	30,17±1,51	37,73±1,54	521,57±46,14	41,59±7,71	0,77±0,04
	DSK	25,00±1,15	35,29±0,73	429,98±78,05	26,81±3,68	0,91±0,09
	RDN	24,00±1,98	25,50±0,99	328,32±32,88	21,63±1,87	1,10±0,07

Kod genotipa Ailsa Craig, broj plodova po biljci je bio znatno manji kod tretmana DSK i RDN u odnosu na biljke u tretmanu ON. U tretmanu DSK njihov broj je opao za 20,7%, a u tretmanu RDN za 24,6%. Statističkom analizom podataka utvrđena je značajna razlika između tretmana ON i DSK ($p<0,01$) i ON i RDN ($p<0,001$), dok između tretmana ON i DSK nije utvrđena statistički značajna razlika.

Sličan trend se javio i kod mutanta *flacca*. U tretmanu DSK broj plodova po biljci je bio manji za 17,1%, a u tretmanu RDN za 20,4% u odnosu na uslove kontrole. Statistički značajna razlika utvrđena je između tretmana ON i DSK i tretmana ON i RDN ($p<0,05$). Dvofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA), došlo se do zaključka da na broj plodova po biljci značajno utiču tretman i genotip ($p<0,001$), dok interakcija tretmana i genotipa nije statistički značajna.

Tretmani navodnjavanja (ON, DSK, RDN) su imali različite uticaje na prečnike plodova kod posmatranih genotipova. Kod Ailsa Craig, u tretmanu DSK, na kraju eksperimenta, došlo je do povećanja prečnika plodova za 8,6% u odnosu na ON biljke. U tretmanu RDN prečnik plodova se smanjio za 10,2%. Statistički značajna razlika kod posmatranih prečnika plodova ustanovljena je između tretmana ON i DSK ($p<0,05$),

ON i RDN ($p < 0,05$) i DSK i RDN ($p < 0,01$). Kod mutanta *flacca*, na kraju eksperimenta, utvrđeno je smanjenje prečnika plodova i to u tretmanu DSK za 6,5% i tretmanu RDN za 32,4%. Statistički značajna razlika utvrđena je između tretmana ON i RDN, kao i DSK i RDN ($p < 0,001$), dok između ON i DSK nisu nađene značajne razlike u veličini plodova na kraju eksperimenta. ANOVA testom, došlo se do zaključka da na konačan prečnik plodova značajan uticaj imaju i tretman navodnjavanja i genotip ($p < 0,001$), dok interakcija genotipa i tretmana nije statistički značajna.

Analizom uticaja tretmana navodnjavanja na prinos biljaka (svežu masu) kod genotipa Ailsa Craig, utvrđeno je da tretman DSK nije statistički značajno uticao na smanjenje prinosa. Ipak, u tretmanu DSK došlo je do smanjenja prinosa za 2,3% u odnosu na ON biljke. U tretmanu RDN, redukcija prinosa je bila znatno veća i iznosila je 30,1%. Statistički značajna razlika utvrđena je između tretmana ON i RDN ($p < 0,001$) i DSK i RDN ($p < 0,01$). Kod mutanta *flacca* došlo je do smanjenja prinosa u tretmanu DSK za 17,6%, ali je verovatno da zbog veće standardne greške nije utvrđena statistički značajna razlika između tretmana ON i DSK. U tretmanu RDN došlo je do smanjenja prinosa za 37% u odnosu na ON. Statistički značajna razlika se ispoljila samo između tretmana ON i RDN ($p < 0,01$). Dvofaktorijskom analizom varijanse ustanovljeno je da na prinos utiču genotip, tretman, kao i interakcija genotipa i tretmana ($p < 0,001$).

Na suhu masu plodova po biljci, kod oba genotipa značajan uticaj je imao tretman RDN. Kod genotipa Ailsa Craig u tretmanu DSK došlo je do redukcije suve mase plodova za 15,9%, a kod RDN za 32,9% u odnosu na ON. Statističkom analizom podataka došlo se do zaključka da veoma značajna razlika postoji između tretmana ON i RDN i DSK i RDN ($p < 0,001$), dok između tretmana ON i DSK nije utvrđena statistički značajna razlika. Kod mutanta *flacca*, došlo je do redukcije suve mase plodova za 35,5% u tretmanu DSK i 48% u tretmanu RDN. Statistički značajna razlika postoji između tretmana ON i RDN, kao i DSK i RDN ($p < 0,01$). ANOVA testom utvrđeno je da na suhu masu plodova po biljci utiču genotip, tretman i interakcija genotipa i tretmana ($p < 0,001$).

Količina utrošene vode za zalivanje biljaka u toku trajanja ogleda bila je različita kod posmatranih genotipova. Više vode u svim tretmanima utrošeno je za zalivanje genotipa Ailsa Craig, u odnosu na mutant *flacca*. Kod oba genotipa, najviše vode korišćeno je u tretmanu ON, zatim u tretmanu DSK, pa RDN. Kod genotipa Ailsa Craig

za tretman ON utrošeno je 28,5 l vode, u tretmanu DSK 21 l vode (za 26,3% manje u odnosu na ON) i u tretmanu RDN 14,5 l vode (za 49,1% manje nego u tretmanu ON). Kod mutanta *flacca*, u tretmanu ON utrošeno je 18 l vode, u tretmanu DSK 14 l vode (22,2% manje) i u tretmanu RDN 11,5 l (36,1% manje u odnosu na ON).

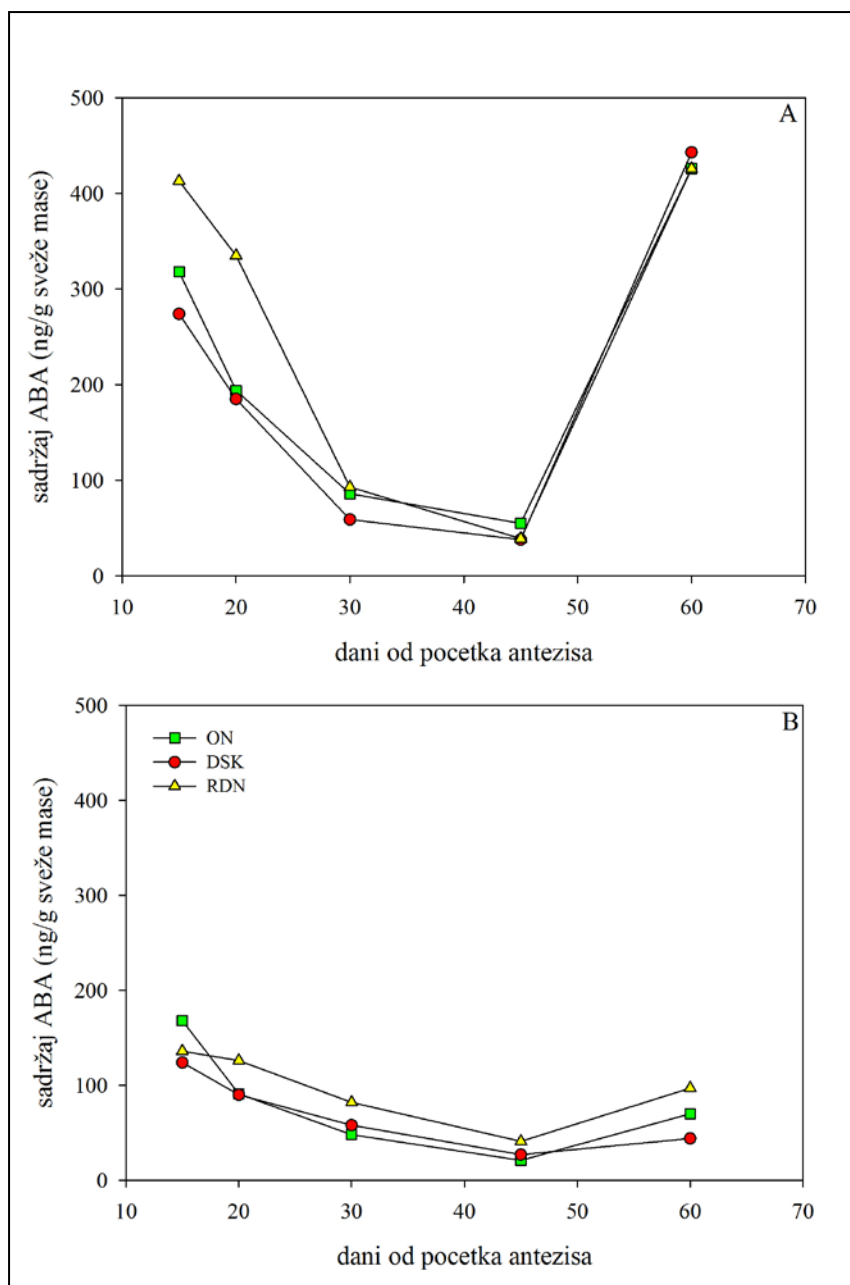
Razlike u količini utrošene vode za zalivanje i ostvarenom prinosu su uslovile da je kod Ailsa Craig, efikasnost korišćenja vode (eng. water use efficiency – WUE) bila najmanja u tretmanu ON, dok je u tretmanima DSK i RDN bila znatno veća (za 69,1% i za 73,7%). Statističkom analizom podataka (t-testom) utvrđeno je da postoji veoma značajna razlika između tretmana ON i DSK ($p < 0,001$) i tretman ON i RDN ($p < 0,01$), dok između tretmana DSK i RDN nije utvrđena statistički značajna razlika. Kod *flacca* mutanta u tretmanima DSK i RDN takođe je došlo do povećanja efikasnosti korišćenja vode za 18,2% i 42,9%. Značajna razlika utvrđena je samo između tretmana ON i RDN ($p < 0,01$), dok između ON i DSK, kao i DSK i RDN nije utvrđena statistički značajna razlika. Verovatno je uzrok tome bila značajna varijabilnost rezultata merenja ispitivanih parametara. Dvofaktorijalnom analizom varijanse došlo se do zaključka da na WUE značajan uticaj imaju tretman i genotip ($p < 0,001$), dok interakcija tretmana i genotipa nema statističku značajnost.

5.2. Biohemijske analize na nivou plodova

Biohemijska analiza rastenja plodova je od značaja za razumevanje njihovog rastenja i sazrevanja. Ona je urađena na osnovu sledećih merenja u tretmanima ON, DSK i RDN: sadržaja ABA u perikarpu plodova i aktivnosti enzima peroksidaze u zidovima ćelija egzokarpa plodova. Proteomik analiza perikarpa plodova obavljena je za tretmane ON i DSK.

5.2.1. Sadržaj ABA u plodovima

Uticaj tretmana navodnjavanja (ON, DSK, RDN) na sadržaj ABA u perikarpu plodova paradajza genotipa Ailsa Craig i mutanta *flacca* prikazani su na Sl. 22 i u Tab. 9.



Slika 22. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na sadržaj ABA u perikarpu ploda paradajza genotipa Ailsa Craig (A) i *flacca* mutanta (B).

Uzorci plodova uzimani su u različitim fazama razvoja plodova: 15. i 20. dana posle antezisa (dpa) – u fazi intenzivnog rastenja ćelija i ubrzanog povećanja zapremine ćelija, 30. dpa – u fazi početka sazrevanja plodova, 45. dpa – faza kada počinje akumulacija karotenoida u plodovima i 60. dpa – u fazi zrelih plodova.

Tabela 9. Vrednosti ABA u plodovima (ng/g sveže mase) pod uticajem tretmana ON, DSK i RDN kod genotipa Ailsa Craig i mutanta *flacca*.

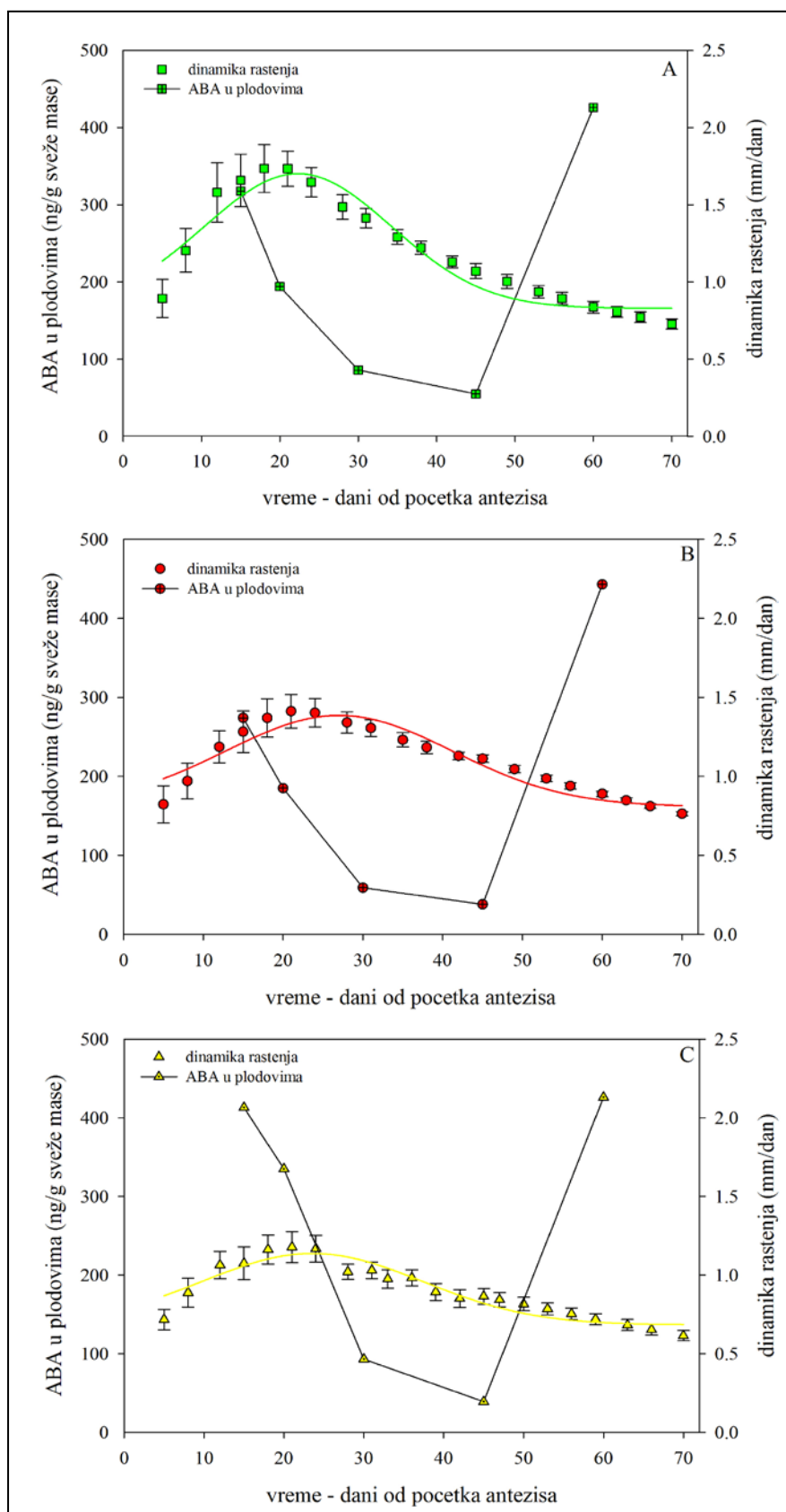
gen./tret. \ dpa		15	20	30	45	60
Ailsa Craig	ON	318,83±28,46	194,10±30,61	86,82±8,54	55,56±10,23	426,94±20,20
	DSK	274,24±24,54	185,50±17,42	59,82±12,48	38,76±1,85	443,05±15,72
	RDN	413,34±31,11	335,67±19,99	93,64±7,80	39,35±13,13	426,39±13,88
<i>flacca</i>	ON	168,37±15,67	91,94±8,80	48,55±11,41	21,48±4,13	70,64±12,47
	DSK	124,85±8,16	90,69±9,71	58,87±14,00	27,48±9,05	44,18±12,72
	RDN	136,13±7,06	126,63±15,82	82,56±22,24	41,56±3,39	97,87±12,35

Kod genotipa Ailsa Craig sadržaj ABA u perikarpu plodova paradajza gajenih u optimalnim uslovima navodnjavanja je imao trend smanjenja količine od 318,83 ng/g sveže mase (faza 15. dpa) do 55,56 ng/g sveže mase (faza 45. dpa) da bi potom nastavio da raste dostižući maksimalne vrednosti od 426,94 ng/g sveže mase (faza 60. dpa). Slična dinamika, ali znatno sporija i sa manjom promenom, se ispoljila i u plodovima biljaka izloženih DSK tretmanu. Razlike u ispitivanim fazama nisu bile statistički značajne. Rezultati za RDN tretman su pokazali da su vrednosti ABA u početnim fazama merenja (15. i 20. dpa) bile značajno veće (oko 40 i 70%) od vrednosti izmerenih u ON i DSK uslovima. Te su razlike bile statistički značajne u ovim fazama (za 15. dpa, $p < 0.05$ i za 20. dpa od $p < 0.05$ i $p < 0.01$). Merenja ABA u kasnijim fazama razvića plodova RDN biljaka nisu pokazala statistički značajne razlike u odnosu na odgovarajuća merenja kod ON i DSK biljaka.

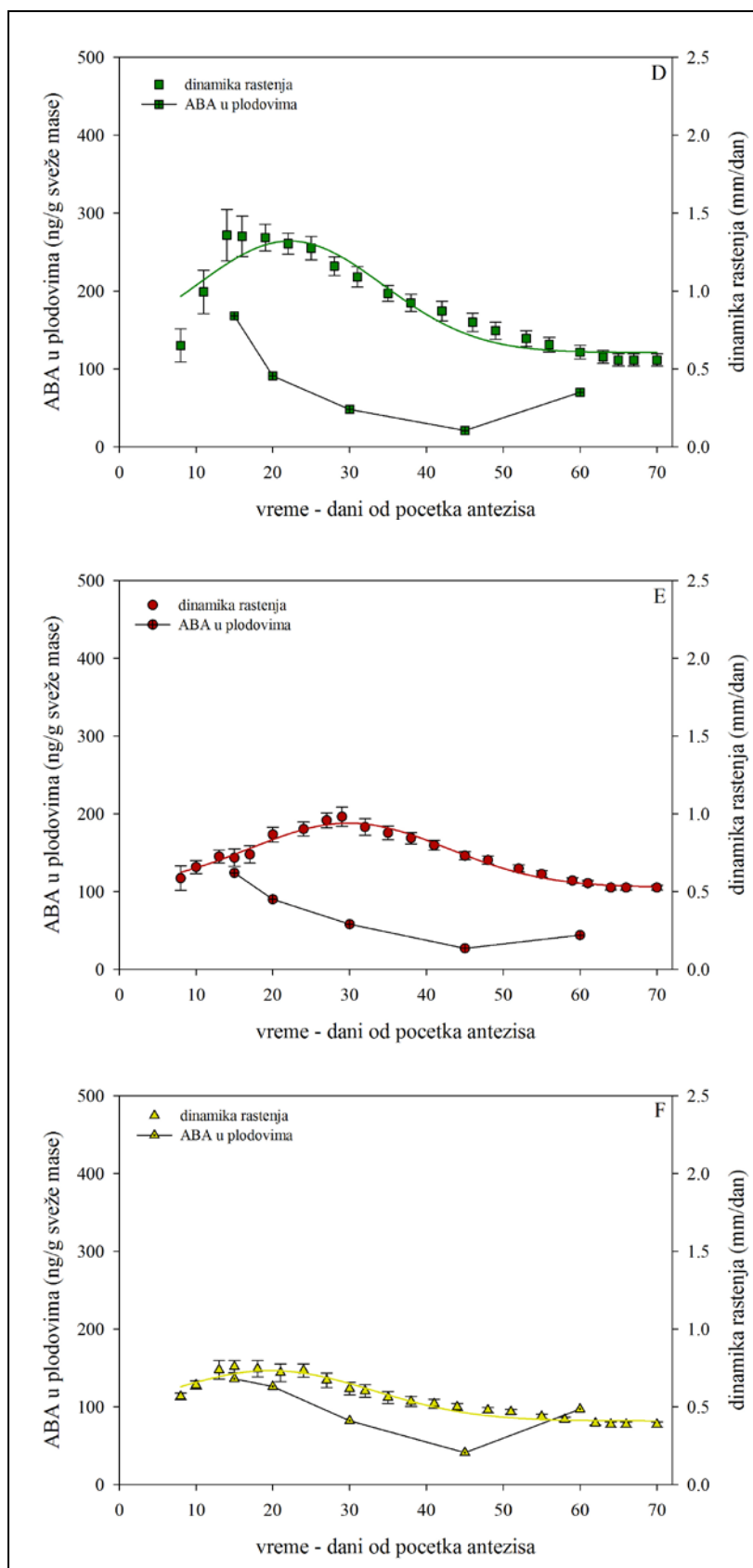
U plodovima mutanta *flacca* dinamika promene sadržaja ABA po fazama razvića ploda i u ispitivanim tretmanima je pokazala sličan trend kao i kod plodova Ailsa Craig biljaka. Vrednosti ABA se smanjuju od 15. dpa faze kada izmerene vrednosti iznose 168,37 ng/g sveže mase (ON biljke), 124,85 ng/g sveže mase (DSK biljke) i 136,13 ng/g sveže mase (RDN biljke) do faze 45. dpa (ON - 21,48 ng/g sveže mase, DSK - 27,48 ng/g sveže mase i RDN - 41,56 ng/g sveže mase) i potom opet rastu u 60. dpa fazi (ON - 70,64 ng/g sveže mase, DSK - 44,18 ng/g sveže mase i RDN - 97,87 ng/g sveže mase). Statistički značajne razlike su utvrđene u fazi 45. dpa (ON/RDN, $p < 0.05$) i 60. dpa fazi (DSK/RDN, $p < 0.05$).

Na Sl. 23 i 24 predstavljeni su uporedo rezultati akumulacije ABA i krive rastanja plodova Ailsa Craig i *flacca* mutanta u različitim fazama i pod dejstvom ispitivanih tretmana. Ovi rezultati pokazuju da količina ABA opada u periodu koji odgovara intenzivnom rastanju plodova u sva 3 tretmana. Posle 45. dpa, kada plodovi prestaju sa rastom, količina ABA u plodovima se naglo povećava u oba genotipa i u svim tretmanima i dostiže svoj maksimalni pik u fazi 60. dpa.

Dvofaktorijskom analizom varijanse utvrđeno je da u početnim fazama razvića plodova na sadržaj ABA u perikarpu plodova paradajza značajan uticaj imaju tretman (15. dpa - $p < 0.01$, 20. dpa - $p < 0.001$) i genotip ($p < 0.001$), kao i interakcija tretmana i genotipa ($p < 0.05$). U fazama 30. i 45. dpa, tretman, genotip i interakcija ova dva faktora nemaju statistički značajan uticaj na sadržaj ABA u plodovima. U fazi 60. dpa, utvrđeno je da na sadržaj ABA u perikarpu plodova značajan uticaj ima samo genotip ($p < 0.01$).



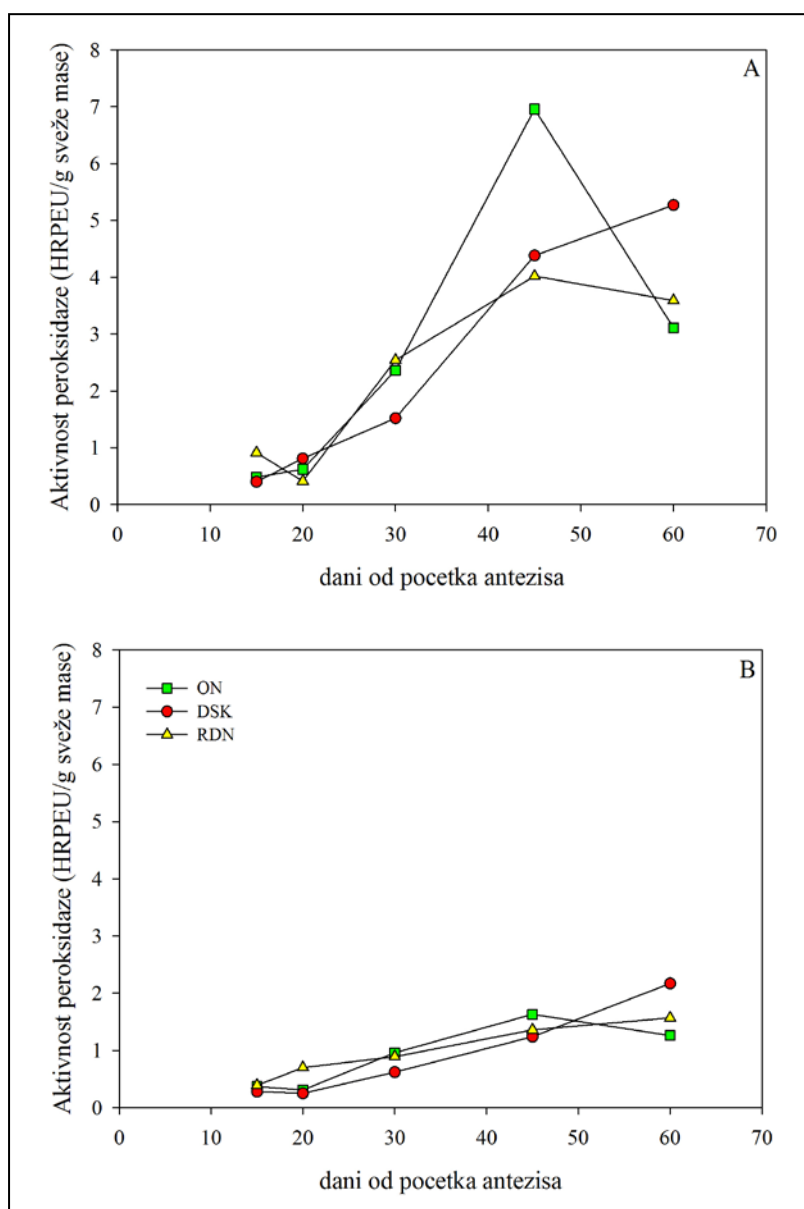
Slika 23. Sadržaj ABA u plodovima i dinamika rastenja plodova kod genotipa Ailsa Craig u tretmanima ON (A), DSK (B) i RDN (C).



Slika 24. Sadržaj ABA u plodovima i dinamika rastenja plodova kod *flacca* mutanta u tretmanima ON (D), DSK (E) i RDN (F).

5.2.2. Aktivnost peroksidaze u različitim fazama razvića plodova

Biohemijska analiza razvića plodova obuhvatila je i merenje enzima peroksidaze u ćelijama egzokarpa plodova. Merena je aktivnost jonski vezane peroksidaze ćelijskog zida.



Slika 25. Uticaj tretmana ON, DSK i RDN na aktivnost peroksidaze u egzokarpu ploda paradajza kod Ailsa Craig (A) i *flacca* (B).

Uticaj različitih tretmana navodnjavanja na aktivnost jonski vezane peroksidaze ćelijskog zida iz egzokarpa plodova paradajza, u različitim fazama razvoja plodova genotipa Ailsa Craig i mutanta *flacca* prikazani su na Sl. 25 i u Tab. 10.

Tabela 10. Vrednosti aktivnosti peroksidaze (HRPEU/g sveže mase) u egzokarpu plodova pod uticajem tretmana ON, DSK i RDN kod genotipa Ailsa Craig i mutanta *flacca*.

dpa gen./tret.		15	20	30	45	60
Ailsa Craig	ON	0,48±0,07	0,62±0,06	2,36±0,13	6,96±0,66	3,14±0,29
	DSK	0,40±0,02	0,80±0,11	1,52±0,06	4,38±0,19	5,27±0,29
	RDN	0,91±0,10	0,41±0,05	2,54±0,22	4,08±0,60	3,59±0,41
<i>flacca</i>	ON	0,37±0,03	0,31±0,03	0,96±0,29	1,63±0,43	1,26±0,20
	DSK	0,28±0,08	0,25±0,07	0,62±0,07	1,24±0,06	2,17±0,03
	RDN	0,39±0,09	0,70±0,11	0,89±0,10	1,36±0,11	1,57±0,19

U egzokarpu plodova Ailsa Craig u svim tretmanima je utvrđen trend da aktivnost enzima progresivno raste sa fazama razvića ploda. Taj trend je posebno izražen u periodu između faze 20. dpa i 45. dpa. Ovi rezultati su pokazali da je kod optimalno zalivanih biljaka aktivnost enzima rasla od 0,48 HRPEU/g sveže mase (izmerena posle 15. dpa) do najveće aktivnosti od 6,96 HRPEU/g sveže mase (izmerena u 45. dpa). Odstupanja od ovog trenda su bila u poslednjoj fazi 60. dpa (smanjenje u odnosu na 45. dpa). Sličan trend je zabeležen i u plodovima RDN biljaka, ali sa padom u aktivnosti enzima i između 15. i 20. dpa. U plodovima DSK biljaka aktivnost enzima je kontinuirano rasla u toku ispitivanih faza u razviću plodova. Maksimalne vrednosti aktivnosti peroksidaze (izmerene u toku 45. dpa) su bile značajno manje u egzokarpu plodova RDN biljaka (4,08 HRPEU/g sveže mase) u odnosu na maksimalne vrednosti izmerene u plodovima ON (6,96 HRPEU/g sveže mase) i DSK biljaka (5,27 HRPEU/g sveže mase).

Poređenja između tretmana pokazuju da su se statistički značajne razlike između tretmana ispoljile u sledećim fazama: 15. dpa (ON/RDN, $p<0.05$; DSK/RDN, $p<0.01$), 20. dpa (između DSK/RDN, $p<0.05$), 30 dpa (ON/DSK, $p<0.01$), 45. dpa (ON/DSK, $p<0.01$ i ON/RDN, $p<0.05$) i u toku 60. dpa (ON/DSK, $p<0.01$ i DSK/RDN, $p<0.05$).

U plodovima optimalno zalivanih mutanata *flacca* trend porasta aktivnosti peroksidaze od 0,37 HRPEU/g sveže mase (u početnom periodu) do maksimalne aktivnosti od 1,63 HRPEU/g sveže mase (posle 45. dpa) je sličan trendu promene aktivnosti kod ON i RDN biljaka genotipa Ailsa Craig. Promene aktivnosti enzima u plodovima DSK i RDN biljaka uglavnom prate rastući trend sa maksimalnim vrednostima aktivnosti izmerenim na kraju ispitivanog perioda (2,17 i 1,57 HRPEU/g sveže mase).

Statistička analiza efekata tretmana je pokazala da su se između tretmana u ispitivanom periodu ispoljile manje razlike u poređenju sa plodovima Ailsa Craig. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) su se ispoljile samo u toku faze 60. dpa i to između tretmana ON (1,26 HRPEU/g sveže mase) i DSK (2,17 HRPEU/g sveže mase).

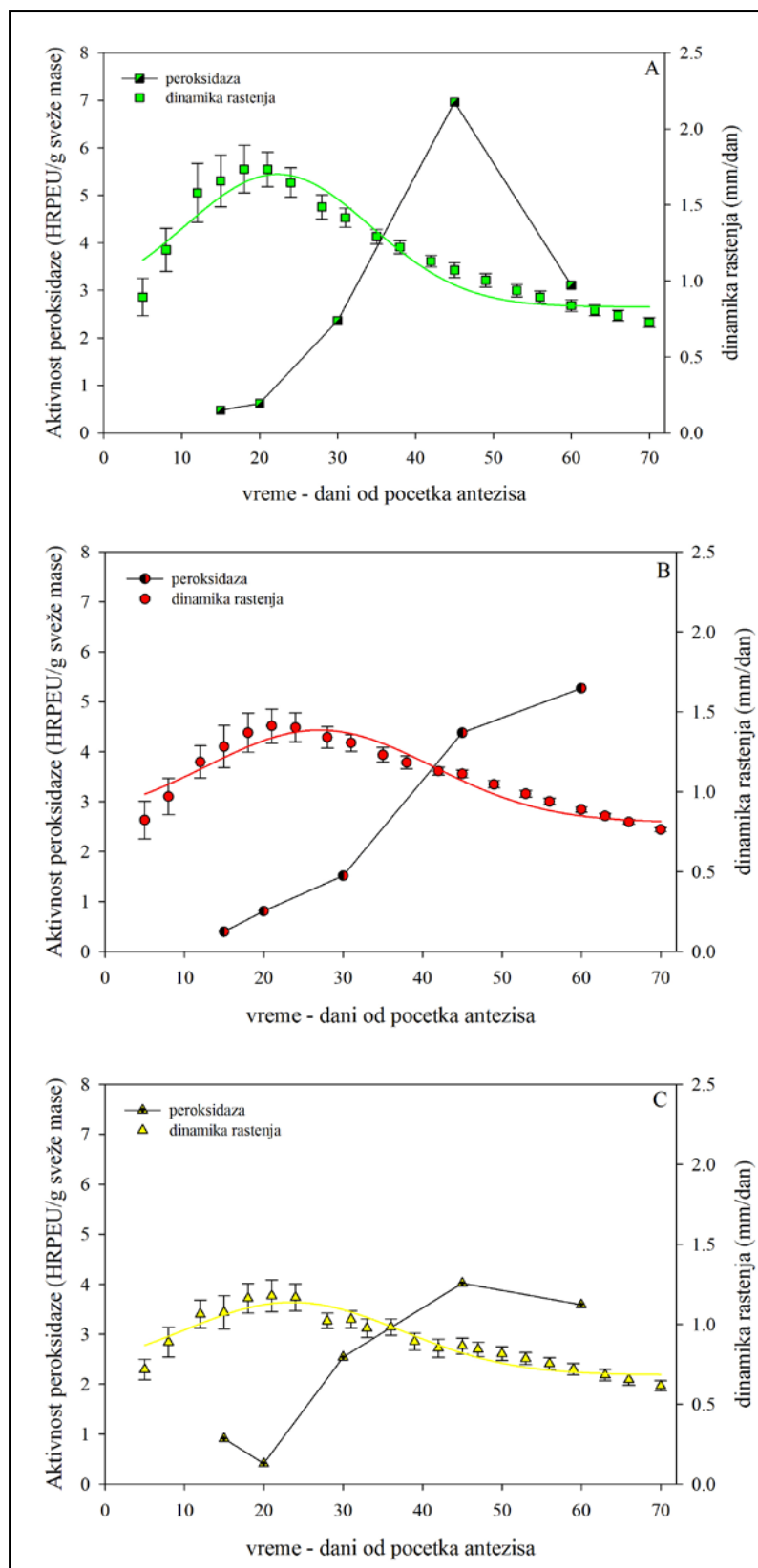
Dvofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA), utvrđeno je da u fazi 15. dpa na aktivnost peroksidaze u egzokarpu plodova paradajza statistički značajan uticaj imaju tretman ($p < 0,05$) i genotip ($p < 0,01$), a u 20. dpa značajan uticaj imaju genotip ($p < 0,01$) i interakcija genotipa i tretmana ($p < 0,001$), dok uticaj tretmana nema statističku značajnost. Ovakav rezultat je najverovatnije posledica neravnomerne brzine rastenja plodova u ispitivanim tretmanima. U 30., 45. i 60. dpa na aktivnost peroksidaze značajan uticaj imaju tretman i genotip ($p < 0,001$), dok interakcija ova dva faktora nema statistički značajan uticaj na aktivnost peroksidaze ćelijskog zida iz egzokarpa plodova.

Da bi se objasnila moguća uloga peroksidaze u rastenju ćelija plodova obavljena su uporedna ispitivanja aktivnosti ovog enzima i krive rastenja plodova. Kod genotipa Ailsa Craig, u tretmanu ON, maksimalna brzina rastenja zabeležena je 18. dpa. Posle tog perioda i aktivnost peroksidaze u egzokarpu plodova počinje naglo da se povećava i raste do 30. dpa, kada se usporava intenzivno rastenje plodova. U tretmanu DSK, aktivnost peroksidaze počinje da raste posle 20. dpa i do kraja trajanja oglada konstantno raste, a najveća promena u aktivnosti je zabeležena između 30. i 45. dpa. U tretmanu DSK se tek oko 38. dpa usporava intenzivno rastenje plodova, što se poklapa sa najvećom promenom u aktivnosti peroksidaze iz egzokarpa plodova. U tretmanu RDN aktivnost peroksidaze se naglo povećava posle 20. dpa i raste do 30. dpa, što se takođe poklapa sa prestankom intenzivnog rastenja i početka sazrevanja plodova (Sl. 26).

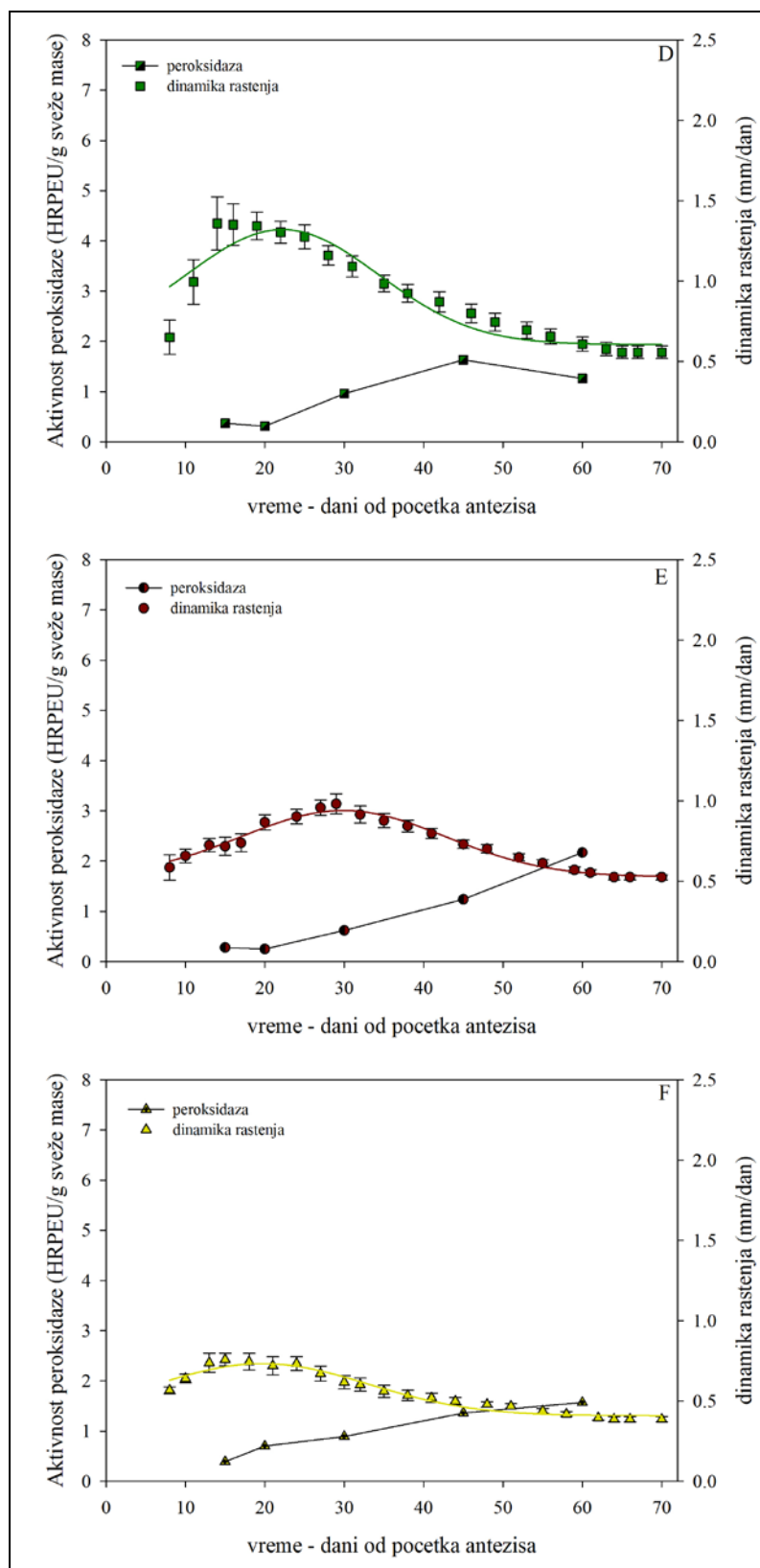
Kod optimalno zalivanih mutanata *flacca* (Sl. 27) aktivnost peroksidaze počinje da raste posle 20. dpa i nagli skok u aktivnosti peroksidaze traje do 30. dpa, što se poklapa sa prestankom intenzivnog rastenja plodova. U tretmanu DSK, intenzivan porast u aktivnosti peroksidaze dešava se u periodu oko 30. dpa, što je u skladu sa prestankom intenzivnog porasta plodova, jer je u ovom tretmanu maksimalna brzina rastenja plodova izmerena 29. dpa i traje do 38. dpa. U tretmanu RDN, aktivnost peroksidaze postepeno raste od 15. dpa i ovaj porast traje do kraja ogleda.

Najveći porast aktivnosti peroksidaze u svim tretmanima događa se između faze početka sazrevanja plodova i akumulacije karotenoida u plodovima, kada se maksimalno usporava rastenje plodova. Kod genotipa Ailsa Craig, u tretmanu ON, to je period između 30. i 45. dpa, kada je izmerena i najveća aktivnost peroksidaze, a zatim sa sazrevanjem plodova njena aktivnost naglo opada. U tretmanu DSK, period intenzivnog porasta aktivnosti peroksidaze traje do 60. dpa, ali je u tretmanu DSK produžen period intenzivnog rastenja plodova, pa samim tim i period početka sazrevanja plodova se javlja kasnije. U tretmanu RDN sličan je trend kao i kod kontrole. Period intenzivnog porasta aktivnosti peroksidaze traje od 30. do 45. dpa, kada je zabeležena maksimalna aktivnost, a zatim do 60. dpa njena aktivnost naglo opada.

Kod mutanta *flacca*, u tretmanu ON aktivnost peroksidaze raste do 45. dpa, kada dostiže svoj maksimum, a zatim opada do 60. dpa. U tretmanu DSK i RDN aktivnost peroksidaze postepeno je rasla i svoj maksimum dostigla u 60. dpa.



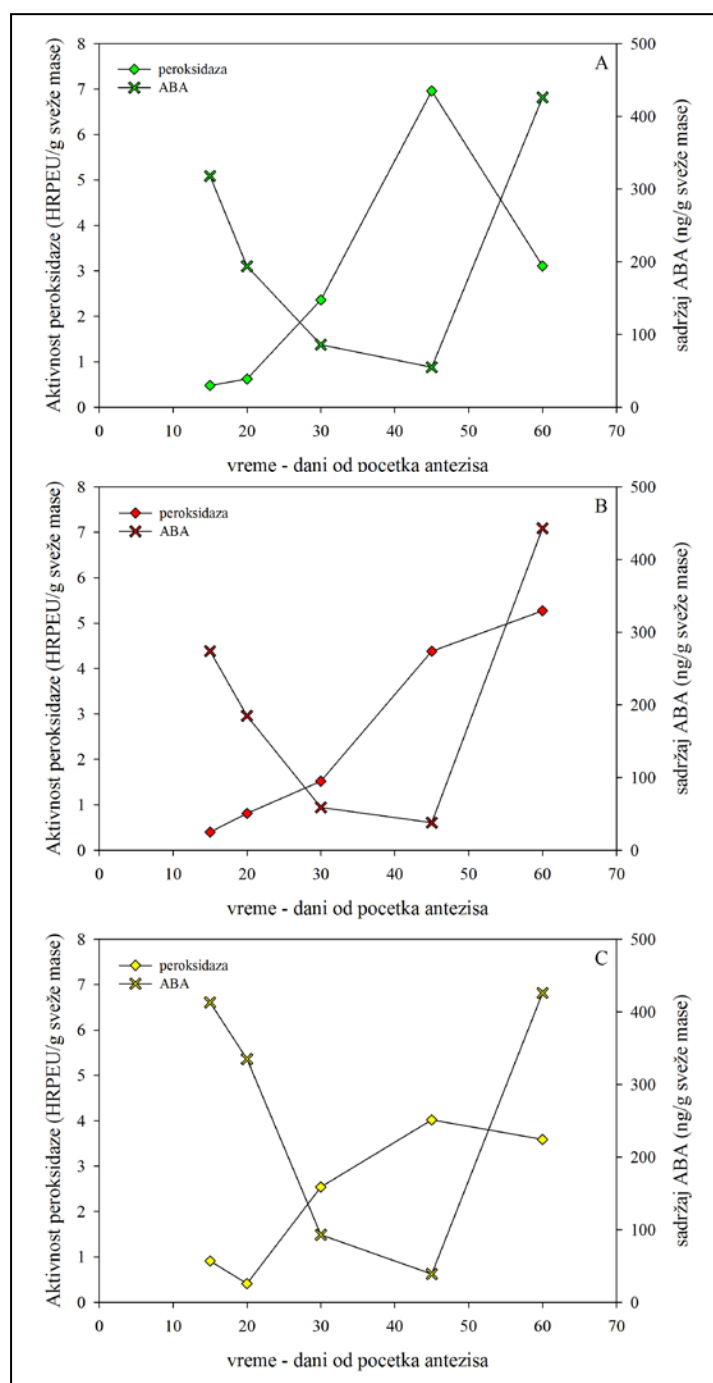
Slika 26. Aktivnost peroksidaze i kriva rastenja plodova kod genotipa Ailsa Craig u tretmanima ON (A), DSK (B) i RDN (C).



Slika 27. Aktivnosti peroksidaze i kriva rastenja plodova kod *flacca* mutanta u tretmanima ON (D), DSK (E) i RDN (F).

5.2.3. Sadržaj ABA i aktivnosti peroksidaze u različitim fazama razvika plodova paradajza

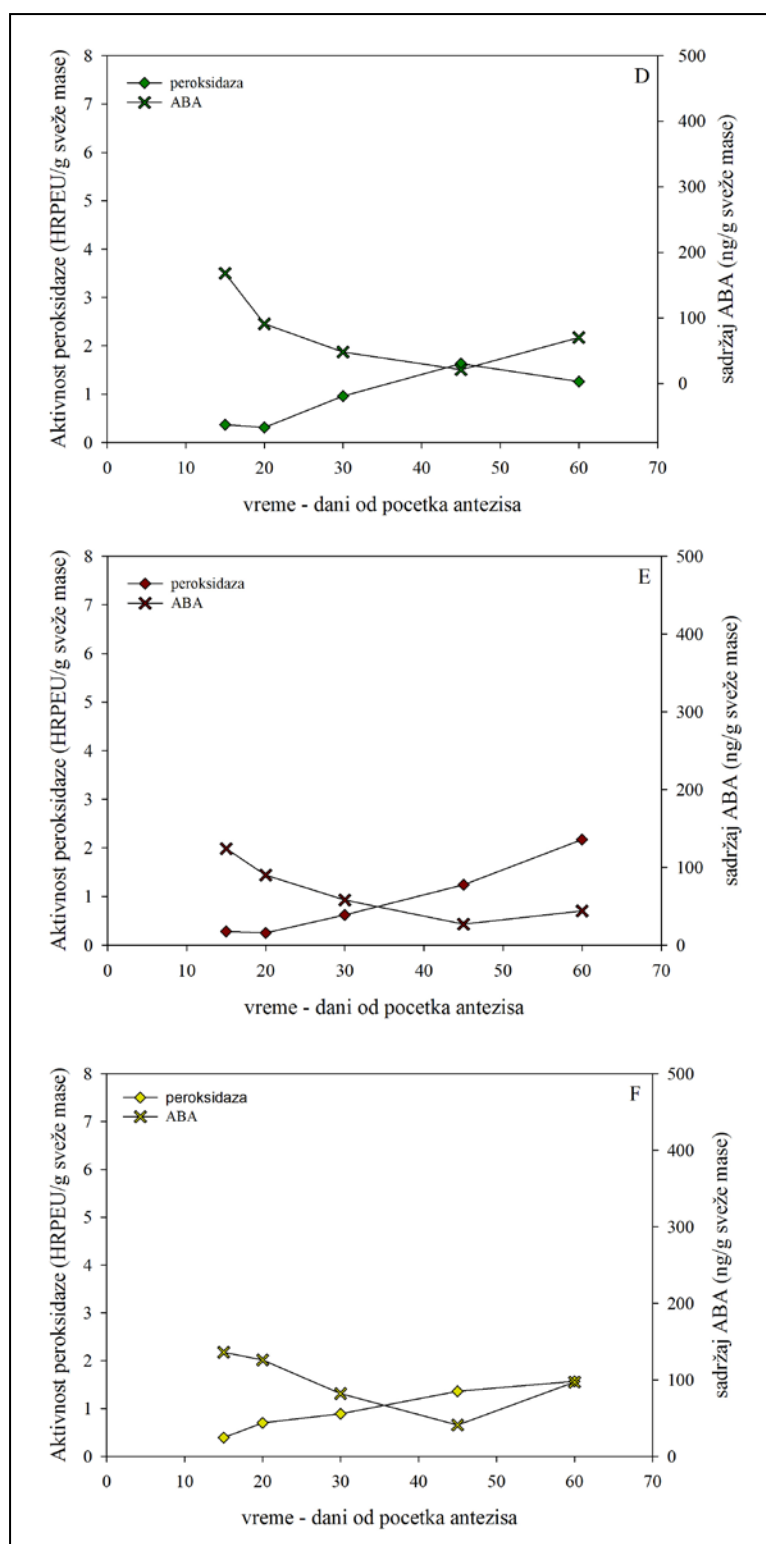
Da bi se bliže objasnili eventualna interakcija ABA i enzima na istom grafiku su predstavljeni rezultati aktivnosti enzima peroksidaze i akumulacija ABA u plodovima ispitivanih biljaka (Sl. 28 i 29).



Slika 28. Aktivnost enzima peroksidaze i količina ABA u plodovima genotipa Ailsa Craig u tretmanima ON (A), DSK (B) i RDN (C).

Na Sl. 28 prikazan je odnos sadržaja ABA u perikarpu plodova i aktivnosti peroksidaze ćelijskog zida kod genotipa Ailsa Craig po primenjenim tretmanima. U svim tretmanima, u fazi intenzivnog rastenja plodova količina ABA je velika i kreće se između 300 i 450 ng/g sveže mase ploda, dok je aktivnost peroksidaze minimalna. U kasnijim fazama, kako plodovi završavaju intenzivan porast i počinje sazrevanje plodova, količina ABA se smanjuje i svoj minimum dostiže oko 45. dpa u periodu kada započinje proces sinteze karotenoida u plodovima. Za to vreme, aktivnost peroksidaze se povećava i u tretmanima ON i RDN u fazi 45. dpa dostiže svoju maksimalnu aktivnost, koja kod tretmana ON iznosi oko 7,5 HRPEU/g sveže mase, a u tretmanu RDN oko 4 HRPEU/g sveže mase. U tretmanu DSK aktivnost peroksidaze tokom celog procesa rastenja i razvića plodova ima postepeni porast. Posle 45. dpa u svim primenjenim tretmanima počinje nakupljanje ABA u plodovima paradajza, a maksimalna količina ABA je izmerena 60 dpa kada je u svim tretmanima završeno rastenje plodova. Posle 45. dpa, aktivnost peroksidaze u tretmanima ON i RDN naglo opada.

Na Sl. 29 prikazan je odnos sadržaja ABA i aktivnosti peroksidaze u plodovima *flacca* mutanta. Sadržaj ABA u svim tretmanima bio je najveći u početnim fazama razvoja plodova i u 15. dpa kreće se između 120 i 170 ng/g sveže mase ploda. U tom periodu aktivnost peroksidaze je najmanja u svim tretmanima. Sa rasteњem i razvićem plodova, aktivnost peroksidaze u tretmanu ON postepeno raste i 45. dpa dostiže svoj maksimum, nakon čega njegova aktivnost opada, dok količina ABA u perikarpu plodova postepeno opada do 45. dpa, a zatim je izmeren blagi porast u 60. dpa. U tretmanu DSK, aktivnost peroksidaze raste do 60. dpa, dok sadržaj ABA opada do 45. dpa posle čega je zabeležen veoma mali porast u 60. dpa. U tretmanu RDN količina ABA opada do 45. dpa, nakon čega je zabeležen blagi porast u 60. dpa, dok se aktivnost peroksidaze postepeno povećava za sve vreme rasteњa i razvića plodova.



Slika 29. Aktivnost enzima peroksidaze i količina ABA u plodovima *flacca* mutanta u tretmanima ON (D), DSK (E) i RDN (F).

5.2.4. Proteomik analiza

Proteomik analiza je imala za cilj da ukaže na metaboličke promene koje su se desile u plodovima u tretmanu ON i DSK. Kod analize proteina izvršeno je poređenje:

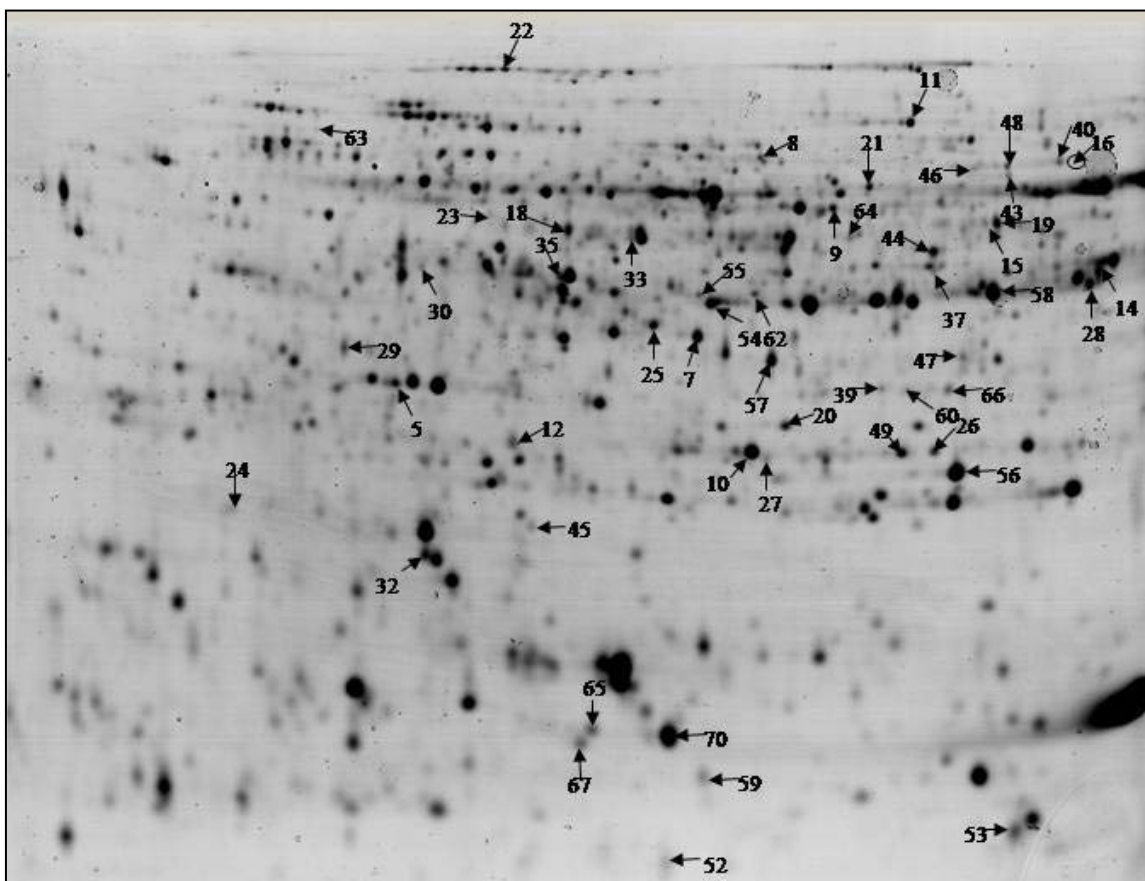
- faze razvića perikarpa plodova u okviru jednog genotipa (15. i 30. dpa);
- 30. dpa faze razvića plodova dva genotipa (Ailsa Craig i *flacca*) i
- efekata tretmana u oba slučaja.

Ukupno je izdvojeno 1679 proteinskih tačaka iz perikarpa ploda paradajza (Sl. 30). Kod 52 proteinske tačke utvrđena je statistički značajna razlika u količinama i položaju koji one zauzimaju na gelu. Ove tačke su isečene sa gela i korišćene za dalje analize masenom spektrometrijom i za identifikaciju. Ukupno su identifikovana 46 proteina iz 52 tačke. Za identifikaciju je korišćena SGN baza podataka. Za preostalih 11 tačaka, nije bila moguća identifikacija na osnovu postojeće baze podataka. Pored toga, dve tačke su pokazale različite modele ekspresije (obe i povećanu i smanjenu) iako je njihovom identifikacijom utvrđeno da je u pitanju isti protein (enolaza), pa su zbog toga one obeležene različitim brojevima, kao tačka 9 i tačka 33 (Tab. 11).

Identifikovani proteini su svrstani u osam funkcionalnih grupa kako bi se obezbedilo lakše poređenje između genotipova, faze razvića i tretmana kod posmatranih plodova. Na osnovu njihove lokalizacije i funkcije koju obavljaju u ćeliji, podeljeni su na proteine koji učestvuju u ili pripadaju grupi:

- metabolizmu ugljenih hidrata (13 proteina);
- metabolizmu aminokiselina (5 proteina);
- sinteze i degradacije proteina (8 proteina);
- proteina energetskog metabolizma (3 proteina);
- proteina ćelijskog zida (5 proteina);
- proteina oksidativnog stresa (8 proteina);
- proteina koji učestvuju u odbrani od stresa i „heat shock“ (HSP) proteini (4 proteina) i
- proteina sa nepoznatom funkcijom (6 proteina).

U Tab.11 je prikazan veći broj pokazatelja uključujući identifikacione brojeve proteina (tačke na gelu), identifikacione parametre, napomene i predviđene lokalizacije, teorijske i izračunate pI/Mr vrednosti, statistički značajne razlike dobijene poređenjem genotipova, faze razvića i tretmana, kao i njihove interakcije.



Slika 30. Izgled gela sa proteinskim tačkama iz perikarpa ploda paradajza.

5.2.4.1. Analiza proteina u različitim fazama razvića ploda genotipa Ailsa Craig

Kod 29. proteina utvrđena je statistički značajna razlika u ekspresiji, u različitim fazama razvića perikarpa (15. i 30. dpa) u okviru oba tretmana (DSK i ON).

Poređenjem faze razvića 15. i 30. dpa, kod DSK tretmana, utvrđeno je da povećanu ekspresiju u fazi 30. dpa imaju devet proteina. Najviše proteina sa ovakvim trendom pripada kategoriji oksidativnog stresa (4 proteina: tačke 10, 20, 49 i 70), zatim oni koji učestvuju u procesima biosinteze i degradacije proteina (2 proteina: tačke 39 i 40), metabolizmu ugljenih hidrata (tačka 46), proteini ćelijskog zida (tačka 60) i proteini

koji pripadaju kategoriji odbrane od stresa i HSP (tačka 11). Broj proteina koji imaju smanjenu ekspresiju je manji. Tu su se izdvojila samo tri proteina koji su svrstani u kategoriju metabolizma ugljenih hidrata (tačke 33, 54 i 58).

Kod biljaka u ON tretmanu, samo su četiri proteina imala povećanu ekspresiju u fazi 30. dpa, u odnosu na fazu 15. dpa. Oni pripadaju kategorijama: metabolizam ugljenih hidrata (2 proteina: tačke 28 i 56), oksidativnog stresa (tačka 57) i odbrani od stresa i HSP (tačka 25). Pored toga, samo je jedan protein imao smanjenu ekspresiju i po funkciji pripada metabolizmu aminokiselina (tačka 64).

Rezultati takođe pokazuju da su 12 proteina iz različitih kategorija imali isti trend ekspresije za vreme rastanja plodova i u DSK i ON tretmanima. Među njima, osam proteina je imalo povećanu sintezu. Oni su pripadali sledećim kategorijama: metabolizmu ugljenih hidrata (2 proteina: tačke 16 i 37), sinteza i degradacija proteina (2 proteina: tačke 14 i 62), proteinima ćelijskog zida (2 proteina: tačke 14 i 62) i za dva proteina nije identifikovana funkcija (tačke 29 i 47). Izdvojena su i četiri proteina sa smanjenom ekspresijom. Oni pripadaju grupama proteina za sintezu i degradaciju (tačke 35 i 55), proteinima ćelijskog zida (tačka 65) i oksidativnog stresa (tačka 45).

5.2.4.2. Analiza proteina kod različitih tretmana genotipa Ailsa Craig

Analiza je zatim obuhvatila poređenje uticaja tretmana na proteine ploda *Ailsa Craig* u različitim fazama njegovog razvića. Poređenjem DSK i ON tretmana u fazi razvića 15. dpa, uočene su razlike kod 18 proteina. Proteini sa povećanom ekspresijom kod DSK tretmana upoređeni su sa istom fazom razvića u ON tretmanu. To su četiri proteina iz tri kategorije: metabolizam ugljenih hidrata (2 proteina: tačke 33 i 54), metabolizam aminokiselina (tačka 35) i oksidativni stres (tačka 45). U fazi 15. dpa broj proteina sa smanjenom ekspresijom u DSK tretmanu je bio veći i obuhvatio je 14 proteina. Oni su bili iz sledećih kategorija: metabolizam ugljenih hidrata (tačka 9), metabolizam aminokiselina (tačka 64), sinteza i degradacija proteina (tačka 26), energetski metabolizam (2 proteina: tačke 21 i 27), proteini ćelijskog zida (3 proteina: tačke 60, 65 i 66), proteini oksidativnog stresa (4 proteina: tačke 10, 20, 49 i 67), proteini koji učestvuju u odbrani od stresa i HSP (tačka 11) i jedan protein (tačka 8) koji spada u kategoriju sa nepoznatom funkcijom.

U fazi 30. dpa, koja je faza bliska početku procesa sazrevanja plodova, utvrđena je razlika u ekspresiji za 17 proteina. Povećanje ekspresije u DSK tretmanu, u poređenju sa ON tretmanom pokazao je samo jedan protein (tačka 32), koji po funkciji pripada grupi odbrane od stresa i HSP. Broj proteina sa smanjenom ekspresijom je bio znatno veći (16 proteina). Oni su po funkciji pripadali sledećim kategorijama: metabolizmu ugljenih hidrata (5 proteina: tačke 16, 23, 28, 48 i 58), metabolizmu aminokiselina (3 proteina: tačke 7, 18 i 43), sinteza i degradacija proteina (2 proteina: tačke 40 i 55), proteinima ćelijskog zida (tačka 14), proteinima oksidativnog stresa (tačka 57), proteinima odbrane od stresa i HSP (tačka 25) i za tri proteina nije identifikovana funkcija (tačke 22, 47 i 52).

Pored navedenih proteina još 13 proteina je pokazalo isti trend ekspresije u različitim tretmanima kod oba genotipa. Povećanu ekspresiju kod DSK tretmana su pokazala samo dva proteina, čija je funkcija bila povezana sa energetskeim metabolizmom (tačka 24) i odbranom od stresa i HSP (tačka 5). Znatno više proteina je imalo smanjenu ekspresiju kod DSK tretmana. To su bili proteini u okviru kategorije metabolizma ugljenih hidrata (5 proteina: tačke 19, 37, 44, 46 i 56), sinteze i degradacije proteina (3 proteina: tačke 12, 15 i 53), proteina ćelijskog zida (tačka 62), proteina oksidativnog stresa (tačka 59) i jedan protein (tačka 63) nepoznate funkcije.

Ovi rezultati su pokazali i značajan efekat interakcije između faze razvića i tretmana. Efekat interakcije je bio primećen kod devet proteina: dva su bila iz kategorije metabolizma ugljenih hidrata (tačka 37 i 44), tri iz kategorije biosinteze i degradacije proteina (tačke 12, 15 i 30), dva proteina čija je funkcija bila vezana za ćelijski zid (tačke 14 i 60), jedan iz kategorije oksidativnog stresa (tačka 59) i jedan protein (tačka 29) čija funkcija nije utvrđena. To ukazuje da različiti nivoi ekspresije ovih proteina nisu samo posledica faze razvića ili primenjenog tretmana, već i njihove interakcije.

5.2.4.3. Analiza proteina kod različitih genotipova paradajza

Analizom proteina perikarpa plodova Ailsa Craig i *flacca* genotipa je utvrđeno da je u okviru oba tretmana (DSK i ON) 41 protein imao različito regulisanu ekspresiju.

Kada su obavljena poređenja Ailsa Craig i *flacca* u okviru DSK tretmana, utvrđeno je da povećanu ekspresiju kod Ailsa Craig pokazuju dva proteina. Njihova funkcija je bila u vezi sa metabolizmom ugljenih hidrata (tačka 46), a jedan protein je bio nepoznate funkcije (tačka 22). Sa suprotnim trendom kod genotipa Ailsa Craig u okviru DSK tretmana nije uočen ni jedan protein.

Analizom perikarpa plodova Ailsa Craig i *flacca* u uslovima optimalne vlažnosti (ON), kod Ailsa Craig uočena je povećana ekspresija velikog broja proteina. Od ukupno 26 proteina sa ovakvim trendom, sedam je pripadalo grupi čija je funkcija u metabolizmu ugljenih hidrata (tačke: 9, 16, 23, 28, 37, 44 i 48), četiri su bili iz grupe metabolizma aminokiselina (tačke: 7, 18, 43 i 64), pet iz grupe sinteza i degradacija proteina (tačke: 12, 15, 26, 39 i 40), dva iz grupe proteina energetskog metabolizma (tačke: 21 i 27), tri iz grupe proteina sa funkcijom vezanom za ćelijski zid (tačke: 14, 60 i 62), tri iz grupe oksidativnog stresa (tačke: 10, 49 i 59), jedan iz grupe odbrane od stresa i HSP (tačka 25) i 1 protein sa nepoznatom funkcijom u ćeliji (tačka 29).

Znatno manji broj proteina je imao smanjenu ekspresiju kod Ailsa Craig u okviru DSK tretmana. Sa takvim trendom, uočena su samo četiri proteina iz sledećih kategorija: metabolizam ugljenih hidrata (tačka 54), oksidativni stres (tačka 45) i odbrana od stresa i HSP (tačke 5 i 32).

Pored toga, analizom je uočeno da devet proteina ima isti trend u oba posmatrana genotipa i u okviru oba tretmana. Rezultati pokazuju da sedam proteina ima povećanu ekspresiju kod Ailsa Craig. Oni su svrstani u sledeće funkcionalne grupe: metabolizam ugljenih hidrata (tačka 19), oksidativni stres (2 proteina, tačke: 67 i 70), odbrana od stresa i HSP (tačka 11) i tri proteina su bila sa nepoznatom funkcijom (tačke: 8, 47 i 63). Samo dva proteina su imala smanjenu ekspresiju kod Ailsa Craig u okviru oba tretmana. Tu su identifikovani proteini iz grupe metabolizma ugljenih hidrata (tačka 33) i iz grupe sinteza i degradacija proteina (tačka 30).

5.2.4.4. Analiza proteina perikarpa paradajza pod uticajem tretmana

Rezultati analize proteina pod uticajem tretmana pokazuju da ukupno 29 proteina ima različitu ekspresiju kod oba genotipa. Najveći broj proteina ima smanjenu ekspresiju kod DSK tretmana u oba genotipa.

Kod Ailsa Craig genotipa, 24 proteina ima smanjenu ekspresiju u okviru DSK tretmana. Najviše proteina sa ovakvim trendom pripada grupi čija je funkcija u metabolizmu ugljenih hidrata (10 proteina, tačke: 9, 19, 23, 28, 37, 44, 46, 48, 56 i 58), zatim slede proteini iz funkcionalne grupe metabolizma aminokiselina (3 proteina, tačke: 7, 18 i 43), po dva iz grupe koji učestvuju u sintezi i degradaciji proteina (tačke: 15 i 40), oksidativnog stresa (tačke: 57 i 59), po jedan iz grupe energetskog metabolizma (tačka 21), proteini ćelijskog zida (tačka 14) i odbrana od stresa i HSP (tačka 25) i četiri proteina čija funkcija nije utvrđena (tačke: 8, 22, 47 i 52). Suprotan trend u okviru Ailsa Craig genotipa ima samo jedan protein, čija je ekspresija povećana u DSK tretmanu i on pripada funkcionalnoj grupi odbrana od stresa i HSP (tačka 5).

Posmatrajući genotip *flacca*, uočena su samo tri proteina sa smanjenom ekspresijom u okviru DSK tretmana, a jedan sa povećanom. Smanjenu ekspresiju imali su proteini iz grupe: metabolizam ugljenih hidrata (tačka 33), sinteza i degradacija proteina (tačka 26) i oksidativni stres (tačka 20). Protein sa povećanom ekspresijom kod *flacca* genotipa u DSK tretmanu, pripadao je grupi nepoznate funkcije u ćeliji (tačka 29).

Statističkom analizom utvrđen je i značajan efekat interakcije između genotipa i tretmana. Efekat interakcije uočen je kod 21 proteina iz sledećih grupa: metabolizam ugljenih hidrata (7 proteina, tačke: 16, 19, 37, 44, 48, 56 i 58), metabolizam aminokiselina (2 proteina, tačke: 7 i 18), sinteza i degradacija proteina (2 proteina, tačke: 15 i 40), energetski metabolizam (tačka 24), proteini ćelijskog zida (2 proteina, tačke: 14 i 62), oksidativni stres (tačka 59), odbrana od stresa i HSP (2 proteina, tačke: 5 i 32) i 4 proteina nepoznate funkcije (tačke: 29, 47, 52 i 63).

Tabela 11. Izolovani proteini iz perikarpa plodova paradajza.

Tačka Br ^{oa}	Br ^{ob}	Br ^{ob}	Vrsta	Identifikovani proteini	Lokalizacija ^c	Teorijske pI / Mr ^d		Izračunate pI / Mr ^e		FR ^f	T ^f	FR/T ^f	15. dpa ^g	30. dpa ^g	G ^f	T ^f	G/T ^f	Ailsa Craig	flacca
Metabolizam ugljenih hidrata																			
9	SGN-U578193	P26300	Solanum lycopersicum	Enolase	cyt	5.68	47.8	6.06	46	nz	***	nz	5.0/-2.1	4.9/-1.2	*	*	nz	4.9/-1.2	3.7/0.4
16	SGN-U577646	Q40546	Nicotiana tabacum	Pyruvate kinase isozyme G	cTP	7.08	61.9	6.63	58	***	***	nz	0.5/-0.1	0.8/-0.2	**	nz	**	0.8/-0.2	0.4/-0.2
19	SGN-U579289	Q41135	Ricinus communis	50 kDa ketoacyl- ACP synthase	cTP	8.00	50.0	6.55	47	nz	***	nz	10.3/-3.7	11.6/-3.6	***	**	*	11.6/-3.6	6.7/0.1
23	SGN-U578195	P29000	Solanum lycopersicum	Acid beta- fructofuranosidase	cyt	5.54	70.1	5.85	48	nz	*	nz	2.3/0.4	3.1/-1.0	*	**	nz	3.1/-1.0	2.3/0.4
28	SGN-U580213	Q8LK04	Solanum tuberosum	Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase	cyt	6.34	36.6	6.54	39	*	**	nz	12.6/-1.1	15.0/-3.2	*	**	nz	15.0/-3.2	12.7/1.1
33	SGN-U579393	P26300	Solanum lycopersicum	Enolase	cyt	5.68	47.8	6.31	51	**	*	nz	6.2/1.3	5.9/-0.4	***	*	nz	5.9/-0.4	8.1/1.3
37	SGN-U575371	Q9FR11	Solanum lycopersicum	Pyruvate dehydrogenase	cTP	8.06	43.4	6.46	42	***	**	***	1.0/-0.5	2.1/-0.8	***	*	**	2.1/-0.8	1.0/-0.1
44	SGN-U566720	Q5XMB8	Nicotiana tabacum	Cytosolic acetoacetyl- coenzyme thiolase	A cyt	6.47	41.3	6.47	44	nz	***	*	10.1/-4.3	11.1/-3.8	***	*	**	11.1/-3.8	5.8/-0.3
46	SGN-U571535	Q2XTC4	Solanum tuberosum	Glucose-6- phosphate dehydrogenase	1- cyt	5.97	58.5	6.52	58	**	**	nz	0.8/-0.3	1.0/-0.3	***	*	nz	1.0/-0.3	0.6/0.0
48	SGN-U578979	Q8GT30	Solanum lycopersicum	Dihydrolipoyl dehydrogenase	mTP	6.90	52.8	6.56	58	nz	**	nz	2.9/-0.8	3.1/-1.1	***	**	*	3.8/-1.1	2.5/0.2
54	SGN-U577224	B9SHB0	Ricinus communis	Alcohol dehydrogenase	cTP	8.61	41.6	6.15	39	**	nz	nz	9.7/2.2	9.0/-0.7	**	nz	nz	9.0/-0.7	11.1/0.9
56	SGN-U579400	Q38JI4	Solanum tuberosum	Triosephosphate isomerase	cyt	5.73	27.0	6.50	28	**	***	nz	33.4/-6.9	36.9/-6.4	nz	**	*	36.9/-6.4	32.9/1.6
58	SGN-U580213	Q8LK04	Solanum tuberosum	Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase	cyt	6.34	36.6	6.69	39	*	*	nz	34.0/1.8	36.0/-7.6	nz	**	*	36.0/-7.6	35.4/1.4
Metabolizam amino kiselina																			
7	SGN-U315784	Q9FS27	Solanum tuberosum	Cytosolic cysteine synthase	cyt	5.93	34.3	6.12	38	nz	**	nz	20.5/-1.6	18.1/-4.3	*	*	**	18.1/-4.3	13.7/- 1.9
18	SGN-U577991	P43281	Solanum lycopersicum	S- adenosylmethionine synthetase	cyt	5.41	43.1	5.95	44	nz	**	nz	14.1/-2.7	14.8/ -5.3	***	**	**	14.8/-5.3	8.3/0.0
35	SGN-U577193	Q9FPT9	Solanum tuberosum	Glutamine synthetase	cyt	5.29	38.6	5.93	41	nz	***	nz	4.2/2.4	5.3/0.7	nz	nz	nz	5.3/0.7	5.9/0.9
43	SGN-U571120	A7YVW1	Actinidia chinensis	ACTCH P5CDH1	cyt	6.36	62.5	6.56	55	nz	**	nz	1.7/-0.6	2.1/-0.7	**	*	nz	2.1/-0.7	1.2/0.1
64	SGN-U580783	P43282	Solanum lycopersicum	S- adenosylmethionine synthetase	cyt	5.76	42.7	6.34	45	*	*	nz	4.5/-1.3	3.3/-0.4	**	nz	nz	3.3/-0.4	2.2/-0.2

Tačka Br ^{od}	Br ^{ob}	Br ^{ob}	Vrsta	Identifikovani proteini	Lokalizacija ^c	Teorijske pI / Mr ^d	Izračunate pI / Mr ^e	FR/ ^f	T/ ^f	FR/T ^f	15. dpa ^g	30. dpa ^g	G/ ^f	T/ ^f	G/T ^f	Ailsa Craig	flacca		
Ssinteza i degradacija proteina																			
12	SGN-U577702	Q40143	Solanum lycopersicum	Cysteine proteinase 3	mTP	8.59	39.0	5.89	30	***	*	**	4.6/-1.3	11.5/-1.9	***	nz	nz	11.5/-1.9	6.2/-0.5
15	SGN-U584866	A0FH76	Solanum tuberosum	EBP1;	cyt	6.26	42.8	6.54	48	**	***	*	1.9/-0.8	2.6/-0.9	***	**	*	2.6/-0.9	1.3/0.0
26	SGN-U565096	Q9XG77	Nicotiana tabacum	Proteasome subunit alpha type-6	cyt	5.92	27.3	6.47	30	nz	***	nz	7.6/-1.9	7.4/-1.0	***	*	nz	7.4/-1.0	6.0/0.5
30	SGN-U573205	Q9FES7	Nicotiana tabacum	Sulfur	cTP	6.0	46.3	5.73	40	***	nz	*	17.9/-1.2	6.7/0.4	***	nz	nz	6.7/0.4	10.1/0.8
39	SGN-U569024	Q2PYY1	Solanum tuberosum	Protein tranzport SEC13-like protein;	cyt	5.84	32.7	6.40	32	***	nz	nz	3.1/-1.2	3.9/-0.3	**	nz	nz	3.9/-0.3	2.3/-0.4
40	SGN-U569332	B9MYQ8	Populus trichocarpa	Predicted protein;	cyt	6.20	60.5	6.64	58	**	***	nz	2.3/-0.8	3.1/-1.1	***	*	***	3.1/-1.1	1.5/-0.5
53	SGN-U591582	B9RT45	Ricinus communis	40S ribosomal protein S21e	cyt	7.81	9.3	6.57	89	nz	**	nz	25.3/-9.3	22.6/-5.3	nz	nz	nz	22.6/-5.3	17.7/-1.2
55	SGN-U584707	Q948X8	Nicotiana tabacum	TOBAC CIG2	cyt	5.10	39.6	6.15	41	**	*	nz	5.5/-0.4	4.6/-0.8	nz	nz	nz	4.6/-0.8	4.9/0.1
Proteini energetskog metabolizma																			
21	SGN-U577869	P05495	Nicotiana plumbaginifolia	ATP synthase subunit alpha	SP	5.84	55.2	6.36	53	nz	**	nz	9.4/-2.0	9.7/-2.3	*	*	nz	9.7/-2.3	7.5/1.5
24	SGN-U583491	P32980	Nicotiana tabacum	ATP synthase delta chain	cTP	8.96	26.8	5.33	24	nz	***	nz	2.9/1.4	2.9/1.3	nz	nz	*	2.9/1.3	3.7/0.1
27	SGN-U568784	O49949	Solanum tuberosum	Magnesium dependent soluble inorganic pyrophosphatase	cyt	5.04	24.8	6.25	30	nz	**	nz	4.5/-1.1	4.4/-0.4	*	nz	nz	4.4/-0.4	3.7/0.2
Proteini ćelijskog zida																			
14	SGN-U578510	A7WPL2	Nicotiana tabacum	Putative cinnamyl alcohol dehydrogenase	cyt	6.59	38.9	6.72	40	***	**	*	5.8/-0.1	13.6/-3.2	***	*	**	13.6/-3.2	8.0/-1.1
60	SGN-U566162	B6ZN57	Nicotiana tabacum	prolyl hydroxylase ⁴⁻	SP	6.34	32.7	6.43	31	**	**	*	3.7/-1.9	4.1/-0.9	**	nz	nz	4.1/-0.9	2.7/-0.1
62	SGN-U577151	Q6IV07	Solanum lycopersicum	UDP-glucose:protein tranzglucosylase-like protein	cyt	5.85	41.2	6.21	41	**	**	nz	2.6/-1.0	3.4/-1.0	***	nz	*	3.4/-1.0	1.7/-0.1
65	SGN-U578527	O04070	Solanum commersonii	SGRP-1 protein;	cyt	7.80	15.8	6.01	15	***	**	nz	30.4/-8.2	19.7/-2.2	nz	nz	nz	19.7/-2.2	18.9/-3.4
66	SGN-U574142	D2D2Z3	Gossypium hirsutum	UDP-L-rhamnose synthase	cyt	5.73	33.7	6.48	31	nz	**	nz	5.6/-2.3	5.1/-0.7	**	nz	nz	5.1/-0.7	3.4/0.1

Tačka Br ^{oa}	Br ^{ob}	Br ^{ob}	Vrsta	Identifikovani proteini	Lokalizacija ^c	Teorijske pI / Mr ^d		Izračunate pI / Mr ^e		FR ^f	T ^f	FR/T ^f	15. dpa ^g	30. dpa ^g	G ^f	T ^f	G/T ^f	Ailsa Craig	flacca
Oksidativni stres																			
10	SGN-U580784	Q3I5C4	Solanum lycopersicum	Cytosolic ascorbate peroxidase	cyt	5.61	27.4	6.23	30	***	***	nz	26.8/-9.2	30.1/-3.1	**	nz	nz	30.1/-3.1	23.1/-1.7
20	SGN-U574728	Q9XPR6	Nicotiana tabacum	Thylakoid-bound ascorbate peroxidase	mTP	8.15	47.2	6.27	30	***	*	nz	8.6/-2.2	10.3/-0.7	nz	*	nz	10.3/-0.7	10.5/1.4
45	SGN-U578588	Q7YK44	Solanum lycopersicum	Superoxide dismutase	cTP	6.60	27.9	5.92	24	*	**	nz	3.4/3.1	4.5/0.4	*	nz	nz	4.5/0.4	5.7/-0.7
49	SGN-U578449	Q52QQ4	Solanum lycopersicum	Ascorbate peroxidase	cyt	5.86	27.3	6.43	30	***	*	nz	13.9/-4.8	16.1/-0.1	***	nz	nz	16.01/-0.1	12.1/-0.2
57	SGN-U578074	D2D330	Gossypium hirsutum	Lactoylglutathione lyase	cyt	5.69	32.5	6.24	33	*	**	nz	18.3/-1.5	20.7/-5.2	nz	*	nz	20.7/-5.2	16.2/0.6
59	SGN-U581258	Q201Z4	Solanum berthaultii	Thioredoxin	cyt	5.54	13.6	6.16	14	nz	*	*	14.2/-8.0	9.8/-4.4	**	***	***	9.8/-4.4	6.2/-0.5
67	SGN-U583863	Q7XAV2	Solanum lycopersicum	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SP	6.01	22.3	5.99	15	nz	*	nz	14.2/-3.9	12.9/0.4	***	nz	nz	12.9/0.4	10.1/1.8
70	SGN-U581590	Q43779	Solanum lycopersicum	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	cyt	5.65	15.2	6.14	15	*	nz	nz	53.6/-11.5	54.8/1.4	***	nz	nz	54.8/1.4	42.9/0.7
Odbrana od stresa i “heat shock” proteini																			
5	SGN-U580023	P23322	Solanum lycopersicum	Oxygen-evolving enhancer protein	cTP	5.91	34.9	5.71	31	nz	***	nz	17.0/11.7	14.8/9.3	***	*	***	14.8/9.3	27.5/2.1
11	SGN-U577430	B9RBP6	Ricinus communis	Heat shock protein 70	cyt	5.60	65.1	6.42	69	***	**	nz	9.0/-3.0	9.8/-0.3	***	nz	nz	9.8/-0.3	6.9/0.8
25	SGN-U579203	O81535	Solanum lycopersicum	Annexin p35	cyt	5.84	36.2	6.12	38	*	nz	nz	12.9/1.4	16.8/-3.2	**	**	nz	16.8/-3.2	13.3/1.3
32	SGN-U581281	P29795	Solanum lycopersicum	Oxygen-evolving enhancer protein 2	cTP	8.27	27.8	5.76	22	nz	*	nz	13.3/0.2	13.0/2.9	***	nz	**	13.0/2.9	19.6/2.2
Nepoznata funkcija																			
8	SGN-U566348	B9HK69	Populus trichocarpa	Predicted protein	cTP	6.56	67.6	6.23	60	nz	**	nz	2.9/-0.9	3.2/-0.6	***	*	nz	3.2/-0.6	2.2/0.4
22	SGN-U579849	Q96372	Capsicum annuum	Cell division cycle protein 48 homolog	cyt	5.07	89.3	5.85	101	nz	*	nz	4.6/-0.9	5.7/-1.3	**	**	nz	5.7/-1.3	4.0/0.5
29	SGN-U580030	Q84QE4	Nicotiana tabacum	Putative chloroplast thiazole biosynthetic protein	cTP	5.76	38.0	5.60	33	***	nz	*	3.6/0.3	10.5/-1.1	**	*	***	10.5/-1.1	7.1/-2.6
47	SGN-U566913	B9MVM3	Populus trichocarpa	Predicted protein	cyt	6.31	34.8	6.51	33	***	***	nz	3.9/-0.7	5.6/-1.5	***	***	**	5.6/-1.5	3.9/0.3
52	SGN-U584969	B9NCW0	Populus trichocarpa	Predicted protein	cyt	5.81	11.5	6.13	252	nz	*	nz	14.5/-4.5	14.5/-5.3	nz	*	**	14.5/-5.3	10.2/-0.3
63	SGN-U570828	B9SQB9	Ricinus communis	Ran-binding protein	cyt	4.58	47.4	5.51	67	nz	*	nz	0.7/-0.2	0.6/-0.2	***	nz	**	0.6/-0.2	0.3/-0.1

^a Broj proteinske tačke koja odgovara tački na gelu (Sl. 32).

^b Broj pod kojim su proteini zavedeni u Sol Genomic Network/UniProt bazi podataka.

^c Lokalizacija peptida u ćeliji, na osnovu TargetP softvera: cTP – hloroplast tranzitni peptid, mTP – mitohondrijalni peptid, cyt – citoplazma, SP – sekretorni protein.

^d Teorijska pI i masa (kDa) identifikovanih proteina.

^e Izračunata pI i masa (kDa) identifikovanih proteina pomoću Progenesis softvera.

^f Rezultati ANOVA testa za fazu razvića, genotip, tretman i efekat interakcije; nz – efekat nije statistički značajan, * - $p < 0.01$,

** - $p < 0.001$, *** - $p < 0.0001$.

^g Kvantitativne vrednosti identifikovanih proteina: ON tretman/povećanu (+) ili smanjenu (-) prosečnu vrednost u DSK tretmanu. ANOVA analiza varijanse; DSK – delimično sušenje korenova; ON – optimalno navodnjavanje.

6. DISKUSIJA

6.1. Vodni režim supstrata

Vrednosti sadržaja vode u supstratu, kao što se i očekivalo, su bile značajno niže kod biljaka u tretmanu RDN i u nezalivanoj strani dela supstrata DSK tretmana u odnosu na ON biljke. Kod optimalno zalivanih biljaka sadržaj vode održavan je na oko 36%, što odgovara poljskom vodnom kapacitetu, dok je kod tretmana RDN od početka eksperimenta sadržaj vode u supstratu postepeno opadao, a do kraja eksperimentnog perioda je održavan na oko 18% zapreminskog sadržaja vode u supstratu (Sl. 13A). U tretmanu DSK merenje sadržaja vode u supstratu pokazalo je karakterističnu dinamiku, gde se jasno uočava naizmenično isušivanje supstrata i ponovno navodnjavanje, koje je karakteristično za tehniku DSK. Ovi rezultati su slično rezultatima drugih autora (Kirda *i sar.*, 2004; Liu *i sar.*, 2007; Savić *i sar.*, 2008; Wang *i sar.*, 2010; Zegbe *i sar.*, 2006b) pokazali i da je količina vode u zalivanoj strani DSK tretmana samo u početku bila ista kao kod ON, dok su u daljem periodu ove vrednosti bile za 10% niže od vrednosti ON biljaka.

Međutim, postoje i podaci koji pokazuju i da se ove vrednosti u zalivanoj strani DSK tretmana mogu održati istim kao i kod ON biljaka (Mingo *i sar.*, 2004; Sobeih *i sar.*, 2004). Te razlike su rezultat toga na koji način se obračunava, odnosno održava količina vode za navodnjavanu stranu DSK tretmana. Zbog toga postoje i različiti podaci za količinu vode koja je utrošena u DSK eksperimentima u poređenju sa kontrolnim uslovima. Ona se kreće u oglecima sa paradajzom od 50% (Davies *i sar.*, 2000; Savić *i sar.*, 2008; Zegbe-Domínguez *i sar.*, 2003) i do 100% (Mingo *i sar.*, 2004), dok je u našem ogledu količina vode utrošena u DSK tretmanu kod Ailsa Craig iznosila 70% od utrošene vode u ON uslovima.

Razlike se u oglecima DSK ispoljavaju i u tome pri kom se stepenu suše u nezalivanoj strani vrši okret i ponovno zalivanje. U našim rezultatima promena strane zalivanja u tretmanu DSK vršena je kada sadržaj vode u nezalivanoj strani supstrata dostigne vrednost blizu 18%. Rezultati su takođe pokazali da se posle prvog okreta vreme potrebno za promenu strane zalivanja skraćuje (sa 22 u početku na prosečno 8 u

daljem toku). Ovakva se pojava manifestovala i kod *flacca* biljaka (sa 26 u početku na prosečno 12 u daljem toku, Sl. 13B).

Sličan trend je utvrđen i kod drugih autora (Milosavljević *i sar.*, 2012; Prokić, 2009; Rančić, 2011; Savić *i sar.*, 2008) čak i kada je period trajanja DSK tretmana bio kratak (Mingo *i sar.*, 2004). Ovi rezultati indirektno ukazuju da se biljke posle prve promene strane zalivanja adaptiraju na ove uslove tako što usvajaju brže vodu iz supstrata zalivane strane DSK nego što je to slučaj sa korenovima ON biljaka. Na osnovu literaturnih podataka može se pretpostaviti da je to vezano za hidrauličnu provodljivost korena i aktivaciju kanala za vodu, veću površinu korena do koje dovodi tretman DSK ili pojavu tzv. „hidrauličnog lifta“ (Prieto *i sar.*, 2012). Ispitivanja Hu *i sar.* (2011) su pokazala da DSK biljke mogu da kompenzuju vodni stres u zasušivanoj strani tako što se voda iz relativno vlažnog supstrata u zalivanoj strani kreće ka suvim delovima supstrata preko korenovog sistema biljke. Iako su zalivana i nezalivana strana korenovog sistema hidraulično izolovane, moguće je da se voda iz relativno vlažnog supstrata u zalivanoj strani kreće ka suvim delovima supstrata preko korenovog sistema biljke. Ova pojava je u prirodnim uslovima opisana kao „hidraulični lift“ i predstavlja pasivno kretanje vode između različitih delova zemljišta i u zavisnosti od razlika potencijala vode (gradijenta). Pri tome, u delu zemljišta koje se suši (u prirodnim uslovima najčešće površinski slojevi) voda izlazi iz korena u zemljište sa nižim vodnim potencijalom, dok drugi delovi korenovog sistema, koji se nalaze u vlažnijim delovima zemljišta (obično na većim dubinama) apsorbuju vodu. Na taj način koren ima ulogu „lifta“ koji prenosi vodu iz jednog dela zemljišta u drugi (Caldwell i Dawson, 1998; Prieto *i sar.*, 2012).

Veća brzina usvajanja vode mogla bi biti i posledica veće površine korenovog sistema i bolje hidraulične provodljivosti korena posle navodnjavanja isušivane strane (Kang *i sar.*, 1998; Kang *i sar.*, 2002). Rezultati Prokić i Stikić (2011) su pokazali da DSK tretman i kod Ailsa Craig i *flacca* indukuje razviće veće površine korena. Značajnu ulogu mogu da imaju i kanali za vodu (akvaporini), čija aktivnost raste u uslovima nedostatka vode (Martre, 2002). To zatim može da utiče i na radijalni transport vode na nivou korena (Maurel i Chrispeels, 2001; Tyerman *i sar.*, 2002).

Iako se moglo očekivati da *flacca*, kao ABA mutant koji ima veću transpiraciju u odnosu na Ailsa Craig, ispoljava bržu dinamiku u promeni količine vode, pokazalo se

da je za promenu strane koja se navodnjava i suši prosečno bilo potrebno 12 dana, što je za 4 dana duže od odgovarajuće promene kod Ailsa Craig (prosečno 8 dana). Rezultat sporije dinamike promene količine vode, a koja indirektno može da ukaže na sporije usvajanje vode kod *flacca*, je najverovatnije rezultat slabije razvijenog korenovog sistema u odnosu na Ailsa Craig, kao i manjih potreba za vodom ovih biljaka čija je i sveža i suva masa za 32% manja od mase korena Ailsa Craig (Tab. 2 i 3). Sporije usvajanje vode kod ABA deficijentnog mutanta *flacca* može biti i posledica smanjene hidraulične provodljivosti korena (Holbrook *i sar.*, 2002). Slični rezultati dinamike promene strane zalivanja su dobijeni i u drugim eksperimentima (Pećinar, 2015), pri čemu je promena strane zalivanja kod divljeg tipa bila posle 6 dana, a kod *flacca* isto posle 12 dana.

6.2. Rastenje i razviće biljaka

Primena tretmana navodnjavanja imala je različit efekat na rastenje biljaka kod ispitivanih genotipova. Rezultati merenja visine biljaka pokazuju da su kod oba genotipa najveću visinu imale biljke u tretmanu ON, dok je u tretmanima DSK i RDN visina bila manje ili više redukovana. Ipak, na rastenje izdanka, samo je tretman RDN imao značajan uticaj jer je došlo do smanjenja za 22% u odnosu na ON i DSK biljke (Sl. 14). Rezultati za *flacca* biljke pokazuju sličan trend, odnosno da DSK tretman nije statistički značajno uticao na rastenje dok je RDN doveo do smanjenja visine biljaka od 14% u odnosu na ON (Sl. 14A i B). Sličan efekat DSK tretmana na rastenje paradajza se pokazao i u rezultatima Mingo *i sar.* (2004). U literaturi postoji dosta podataka o tome da je DSK tretman doveo do značajne redukcije rastenja paradajza (Kirda *i sar.*, 2004; Milosavljević, 2012; Rančić, 2011; Stikić *i sar.*, 2003; Zegbe *i sar.*, 2004), vinove loze i krompira (Chaves *i sar.*, 2007; Dos Santos *i sar.*, 2003; Dos Santos *i sar.*, 2007; Kirda *i sar.*, 2004; Liu *i sar.*, 2006b; Zegbe *i sar.*, 2004).

Naši rezultati takođe ukazuju na to da su *flacca* biljke niže u odnosu na genotip Ailsa Craig i to za oko 28%. Utvrđeno je da smanjenje visine *flacca* biljaka može da bude i 46% u odnosu na genotip Ailsa Craig (Jones *i sar.*, 1987), a rezultati sa drugim ABA-mutantima su pokazali da je *notabilis* manji od svog divljeg tipa (Rančić, 2011). Primećeno je takođe da pored smanjenog rastenja, ABA deficijentni mutanti paradajza imaju i morfološke simptome karakteristične za višak etilena, kao što su kovrdžanje

listova i pojava adventivnih korenova, čak i u uslovima kad su dobro snabdeveni vodom (Nagel *i sar.*, 1994; Sharp *i sar.*, 2000). Rezultati Sharp *i sar.* (2000) i Dodd (2003) su pokazali da blokirana sinteza etilena delimično povećava površinu listova.

Smanjeno rastenje izdanka u uslovima suše može nastati kao rezultat delovanja hemijskih ili hidrauličnih signala suše, kao i njihove interakcije (Jovanović i Stikić, 2012). Smanjenje raspoložive količine vode u zemljištu dovodi do redukcije turgora u ćelijama korena i ta promena u vodnom režimu se kao tzv. „hidraulični signal suše“ prenosi od korena do nadzemnih delova, gde deluje tako što dovodi do opadanje turgora u ćelijama i izaziva redukciju rastenja ćelija i otvorenosti stominih ćelija. Do redukcije rastenja i provodljivosti stoma može doći i bez opadanja vodnog režima u ćelijama (bez hidrauličnih signala) i te su promene rezultat tzv. „hemijskih signala suše“. Smatra se da je ABA najvažniji hemijski signal, ali i da njeno dejstvo zavisi od pH čije povećanje (alkalizacija) takođe učestvuje kao signal. Ulogu hemijskih signala mogu da imaju i hormoni citokinini i etilen, ali i neki joni kao npr. Ca^{2+} ili nitrati (Bano *i sar.*, 1993; Bano *i sar.*, 1994; Dodd *i sar.*, 1996; Kudozarova *i sar.*, 2007). Hemijski signal može biti i promena pH ksilema ili apoplasta koja, takođe, utiče na redukciju provodljivosti stoma (Wilkinson, 1999; Wilkinson i Davies, 1997; Wilkinson *i sar.*, 1998) ili rastenje ćelija (Bacon *i sar.*, 1998; Davies *i sar.*, 2002).

U našim istraživanjima nisu mereni parametri vodnog režima (potencijal vode i provodljivost stominih ćelija) ili koncentracija ABA u ksilemu koja bi mogla da ukaže na to da li su efekti DSK ili RDN tretmana na rastenje ispitivanih genotipova rezultat hidrauličnih ili hemijskih efekata. Međutim, može se napraviti poređenje sa efektima na reakcije stominih ćelija istih genotipova u sličnim eksperimentalnim uslovima. Ispitivanja u sličnim eksperimentalnim sistemima, ali sa biljkama Ailsa Craig i *flacca* u vegetativnoj fazi razvića, ukazuju da su hidraulični signali od većeg značaja za reakcije stominih ćelija *flacca* biljaka u suši, dok su hemijski signali značajniji za Ailsa Craig (Prokić, 2009).

Ukupna biomasa biljaka se u svim tretmanima očekivano razlikovala između ispitivanih genotipova (Tab. 2 i 3; Sl. 15 i 17). Ovi rezultati pokazuju da su *flacca* biljke bile ne samo niže, već su imale i znatno manju biomasu od Ailsa Craig. Slični rezultati su dobijeni i kod drugih autora (Bradford, 1983; Rančić, 2011).

Ispitivanja uticaja tretmana na svežu i suhu biomasu Ailsa Craig ukazuje da tretman DSK, u odnosu na ON, nije značajno uticao na konačnu veličinu pojedinačnih organa, kao ni distribuciju biomase. Ispitivanja u optimalnim uslovima (ON) su pokazala sledeću distribuciju sveže biomase: koren – 0,6%, stablo – 7,5%, list 16,4% i plod – 75,6%. U tretmanu DSK biljke su imale sličnu distribuciju biomase: koren – 0,6%, stablo – 7,2%, list – 16,5% i plod – 75,8% (Sl. 16A i 28A). Ovi rezultati odgovaraju rezultatima Mingo *i sar.* (2004) koji se odnose na stablo i listove, ali ne i na biomasu korena. Mingo *i sar.* (2004) kao i drugi autori (Kang *i sar.*, 1998, Liang *i sar.*, 1996) su utvrdili da uslovi delimičnog sušenja korenova dovode do porasta korena.

Rezultati merenja biomase u RDN uslovima su ukazali na malo izmenjenu raspodelu asimilata, jer je utvrđena nešto veća akumulacija biomase u vegetativnim organima u odnosu na kontrolne i uslove DSK. U tretmanu RDN distribucija sveže biomase bila je sledeća: koren – 0,8%, stablo - 9,8%, list – 24,6% i plod – 64,8%. Poređenje ovih rezultata u odnosu na ON ili DSK je pokazalo da je RDN tretman značajno uticao na redukciju sveže mase stabla i plodova, kao i suve mase plodova, dok se takav uticaj nije ispoljio na suhu masu stabla. Slični rezultati efekata deficita navodnjavanja su dobijeni i u drugim RDN eksperimentima kod paradajza (Kirda *i sar.*, 2004) i vinove loze (Chaves *i sar.*, 2007). Iz rezultata odnosa korena/izdanka se takođe vidi da tretmani DSK i RDN nisu uticali u znatnoj meri na rastenje korena, a na taj način na transport i raspodelu asimilata između njih (Tab. 4). Na smanjen transport asimilata iz stabla i listova u plodove u tretmanu RDN ukazuju rezultati odnosa suve mase plodova/izdanka (Tab. 5).

Ispitivanja akumulacije biomase i njene distribucije kod mutanta *flacca* ukazuju na trend povećanja procentualnog učešća vegetativne biomase u odnosu na biomasu ploda kod svih tretmana i u odnosu na Ailsa Craig (Sl. 16B). Kod *flacca* biljaka ispitivani eksperimentalni uslovi nisu imali značajan uticaj na masu vegetativnih organa, izuzev što je tretman RDN značajno redukovao svežu masu stabla. Tako su rezultati za svežu masu u RDN uslovima pokazali sledeću distribuciju: koren – 2,1%, stablo - 16,0%, list – 16,4% i plod – 65,5%. To se značajno razlikovalo od uslova optimalnog zalivanja biljaka (koren – 1,6%, stablo – 16,6%, list 21,3% i plod - 60,5%) ili DSK (koren – 2,3%, stablo – 18,8%, list – 17,8%, plod – 61,2%). Slična distribucija biomase je utvrđena i za suhu masu u ispitivanim organima (Sl. 18B).

Rezultati su takođe pokazali i da je biomasa pojedinih organa *flacca* biljaka u odnosu na Ailsa Craig značajno manja (Tab. 2 i 3). Sveža i suva masa korena *flacca* biljaka je za oko 32% manja u svim tretmanima. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima niza autora (Bradford, 1983; Jones *i sar.*, 1987; Rančić, 2011; Milosavljević, 2012). Jedno od objašnjenja za smanjenu biomasu korena je da *flacca* proizvodi više etilena u korenu od Ailsa Craig (Tal *i sar.*, 1970). Povećana koncentracija etilena, a smanjena sinteza ABA u korenu, može da utiče na rastenje korena (Chen *i sar.*, 2003). Međutim, rezultati drugih autora ukazuju na to da je kod *flacca* korenov sistem značajno kraći (Saab *i sar.*, 1990; Prokić i Stikić, 2011) i ima manju svežu masu (za 60 do 70 %) i suhu masu za 50% do 60% (Milosavljević, 2012; Rančić, 2011) u poređenju sa korenovim sistemom divljeg tipa. Rezultati Holbrook *i sar.* (2002) pokazuju da ABA deficitarni mutanti imaju smanjenu hidrauličnu provodljivost korena što takođe može da objasni manje i sporije usvajanje vode (Sl. 13B).

Prema literaturnim podacima vodni deficit može takođe da deluje različito, ili da inhibira rastenje korena ili da u uslovima umerenog stresa čak povećava rastenje korena (Hooker i Thorpe, 1997). Rezultati Sharp (2002) su pokazali da je efekat suše mnogo manje izražen na nivou korena nego izdanka, jer koren može da nastavi sa rastenjem čak i u uslovima kada je pri niskim vrednostima potencijala vode rastenje izdanka obustavljeno. Manji efekat suše na rastenje korena nego na stablo ili listove je utvrđen i kod paradajza (Kulkarni i Deshpande, 2006).

Naša ispitivanja nisu pokazala da je u DSK uslovima došlo do povećanja biomase korena koje bi moglo da indirektno ukaže da je tretman DSK povećao rastenje korena. Slični rezultati su dobijeni kod paradajza (Davies *i sar.*, 2000) i vinove loze (Dry *i sar.*, 2000). Nasuprot tome rezultati Kang *i sar.* (1998) su pokazali da je DSK sistem povećao biomasu korena kod kukuruza, što je verovatno bio rezultat povećanog rastjenja i razvića bočnih korenova (Liang *i sar.*, 1996). Ispitivanja Mingo *i sar.* (2004) su pokazala da je promena strana zalivanja kod DSK biljaka dovela do značajnog povećanja biomase korena (čak za 55%). Rezultati sa biljkama paradajza u vegetativnoj fazi razvića su takođe pokazali da povećanje broja okreta kod DSK biljaka stimuliše razviće korena, što bi moglo da predstavlja adaptivnu reakciju biljaka kojom se povećava ukupna dužina i površina korena i na taj način se povećava usvajanje pristupačne vode za potrebe razvića biljaka (Prokić, 2009). Ispitivanja su pokazala da

se, takav efekat DSK može potvrditi i na osnovu vizuelne ocene razvića korenova u toku ispitivanog perioda i pri gajenju biljaka u transparentnim sudovima (Prokić i Stikić, 2011).

Zbog svega iznetog teško je objasniti razlike koje su se u našim rezultatima ispoljile u odnosu na druge literaturne podatke. One se mogu pripisati genotipskim razlikama, metodama indukcije vodnog deficita ili DSK tretmana, brzini isušivanja biljaka i trajanju tretmana, metodama merenja korena kao i fazama rastenja biljaka. Zbog toga se može pretpostaviti da je u osnovi razlike između naših i rezultata Prokić i Stikić (2011) dužina trajanja ogleda, kao i faza razvića ispitivanih biljaka kod kojih je DSK tretman primenjen. Ove razlike ukazuju da se porast korena, kao adaptivna reakcija na DSK tretman, brzo odvija i pretpostavka je da se signali za ovakvu adaptaciju verovatno javljaju u prvim fazama suše, kao što se i promene na nivou korena javljaju u početnim fazama razvića korena. Zbog toga se takođe može pretpostaviti da je porast korena, od značaja za adaptaciju biljaka u vegetativnoj fazi, a da su u kasnijim fazama razvića od značaja i efekti već spomenutog tzv. hidrauličnog lifta (redistribucije vode između korenova u zalivanoj i sušenoj strani) ili povećanja hidraulične provodljivosti korena.

U toku vizuelnog praćenja odvijanja fenoloških faza razvića biljaka primećeno je da tretmani DSK i RDN generalno usporavaju razviće, u odnosu na tretman ON i to slično kod oba genotipa (Sl. 19). Kod genotipa Ailsa Craig, prva cvast na glavnom stablu se pojavljuje gotovo istovremeno kod svih primenjenih tehnika navodnjavanja. Uticaj tretmana je uočen tek u fazi cvetanja, kada dolazi do odlaganja cvetanja za 2 dana u tretmanu DSK i 4 dana u tretmanu RDN.

Utvrđeno je i da postoje razlike između posmatranih genotipova u vremenu ulaska biljaka u različite fenološke faze. Kod *flacca* mutanta prva cvast na glavnom stablu se obrazuje oko 2-4 dana ranije u odnosu na Ailsa Craig, ali joj kasnije treba duže vremena za ostale faze. Cvetanje se kod *flacca* biljaka dešava oko 6 dana kasnije u odnosu na Ailsa Craig, pojava plodova tipičnog oblika i veličine od 3-11 dana kasnije i sazrevanje plodova od 7-23 dana kasnije u zavisnosti od primenjenog tretmana. U osnovi ovako značajno kasnijeg sazrevanja *flacca* biljaka u odnosu na Ailsa Craig, je verovatno smanjena mogućnost sinteze ABA kod mutanta, pa je potrebno više vremena dok ne dostigne određenu koncentraciju u tkivima, koja je neophodna kao signalni

molekul za sintezu etilena (Buta i Spaulding, 1994; Jiang *i sar.*, 2000; Kojima *i sar.*, 1993).

6.3. Rastenje i razviće plodova

Rastenje plodova, kao i drugih organa ili biljaka, kao i uticaj različitih faktora na ove procese, se može analizirati pomoću tzv. S krivih rasteња ili krivih koje su simetrične i po obliku zvonaste (Monselise *i sar.*, 1978). Njihov oblik ukazuje na to da li je rastenje nekog organa rezultat promena u deobi ili izduživanju ćelija, a pomoću njih može da se utvrdi i promena brzine u toku određenog vremenskog intervala. Na osnovu sličnih krivih ispitivan je uticaj deficijencije N na rastenje listova linija kukuruza (Jovanović *i sar.*, 2004). Ovi rezultati su pokazali da je na brzinu rasteња ćelija listova kukuruza više uticala deoba ćelija, nego njihovo izduživanje.

U našim istraživanjima cilj S krivih je bio da se utvrdi uticaj tretmana na deobu i izduživanje ćelija ploda, a preko promena dijametra ploda (Sl. 20). Cilj predstavljanja rezultata u formi simetrično-zvonastih krivih je bio da se obavi analiza brzine odvijanja procesa rasteња (Sl. 21). Obe krive su dobijene na osnovu regresione analize trećeg stepena promena prečnika plodova. Rezultati predstavljeni u obliku S krive pokazuju da se posle kratke inicijalne faze rasteња (odgovarala bi fazi deobe ćelija) nastavlja eksponencijalna faza rasteња u kojoj dolazi do izduživanja ćelija egzokarpa, a što se manifestuje intenzivnim porastom dijametra plodova. Posle ove faze brzina rasteња ćelija opada i dostiže vrednosti bliske nuli tako da plodovi dostižu svoju konačnu veličinu. Kada plodovi završe rastenje sledi faza sazrevanja u kojoj se aktivira niz metaboličkih procesa koji rezultiraju obrazovanjem zrelih plodova (Gillaspy *i sar.*, 1993). U tako predstavljenim rezultatima S kriva ukazuje na dužinu trajanja perioda rasteња plodova, dok tzv. zvono kriva ukazuje na maksimalne vrednosti brzine rasteња plodova i njihove promene u toku ispitivanog perioda (Sl. 20 i 21).

Poređenjem kriva rasteња plodova u primenjenim tretmanima uočeno je da su biljke u tretmanu ON imale najveću brzinu rasteња (1,7 mm/dan – Ailsa Craig; 1,3 mm/dan – *flacca*), zatim u tretmanu DSK (1,4 mm/dan – Ailsa Craig; 1 mm/dan – *flacca*), a najmanja brzina rasteња plodova zabeležena je u tretmanu RDN (1,2 mm/dan – Ailsa Craig; 0,7 mm/dan – *flacca*). Krive rasteња takođe upućuju na to da se između

tretmana javlja razlika u dužini trajanja i vremenu pojave maksimalne brzine rastenja plodova.

Kod oba genotipa, maksimalnu brzinu rastenja plodova dostigle su prvo biljke u tretmanu ON i to 5 dana ranije kod genotipa Ailsa Craig i 15 dana ranije kod mutanta *flacca*, u odnosu na tretmane DSK i RDN. Međutim, dužina trajanja perioda intenzivnog rastenja plodova kod genotipa Ailsa Craig, bila je sličnija u tretmanima ON i RDN, dok je u tretmanu DSK ovaj period trajao znatno duže (10 dana duže). Kod *flacca* mutanta period intenzivnog rastenja plodova najkraće traje u tretmanu RDN (12 dana), zatim u tretmanu ON (15 dana), a najduže u tretmanu DSK (19 dana). Kao rezultat produženog perioda intenzivnog rastenja plodova, srednja vrednost prečnika plodova na kraju eksperimenta bila je slična u tretmanima ON i DSK. Kod tretmana RDN kraći period rastenja i manja brzina doveli su do razvića manjih plodova. Krive rastenja plodova nam ukazuju da je na konačnu veličinu ploda paradajza više uticala dužina trajanja procesa rastenja od maksimalne brzina rastenja. Ovakvi rezultati mogu da ukažu i na to da je produžen period ćelijske ekspanzije značajniji za dobijanje većih plodova, nego brzina rastenja plodova.

U literaturi postoje podaci da suša može da utiče na smanjenje brzine rastenja plodova, kao i na smanjenje veličine plodova (Davies *i sar.*, 2000), ali je malo podataka koji se odnose na mehanizam regulacije rastenja plodova u uslovima suše. Rezultati Mingo *i sar.* (2003) su pokazali da hemijski signali, kao što je pH, verovatno imaju regulatornu ulogu u kontroli brzine izduživanja ćelija plodova izloženih vodnom deficitu. Ovi zaključci su zasnovani i na merenju turgora u ćelijama ploda koje se nisu promenile u toku DSK tretmana i odgovarale su vrednostima turgora kao kod optimalno zalivanih biljaka. To potvrđuje da nisu u pitanju tzv. hidraulični signali suše.

U literaturi ne postoji mnogo podataka koji se tiču konačne veličine plodova i efekta različitih spoljašnjih faktora na dužinu trajanja faze ćelijske deobe i fazu intenzivnog rastenja ćelija. Rađena su istraživanja koja se tiču uticaja niskih temperatura na rastenje plodova paradajza, gde je ustanovljeno da mogu značajno da utiču na smanjenje brzine rastenja plodova, konačnu veličinu plodova, ali i da odlože vreme za koje brzina rastenja plodova dostiže svoj maksimum (Adams *i sar.*, 2001; Bertin, 2005). Savić *i sar.* (2008) su u svojim istraživanjima poredili razlike između tretmana DSK, RDN i ON u brzini rastenja ćelija i dužini ćelijske ekspanzije perikarpa plodova

paradajza. Njihovi rezultati pokazuju da je maksimalna brzina rastenja ćelija značajno veća kod optimalno navodnjavanih biljaka u odnosu na DSK i RDN tretman, iako je trajanje ćelijske ekspanzije duže u tretmanu DSK u odnosu na ON i RDN. Kao posledica toga nije utvrđena statistički značajna razlika u veličini plodova između tretmana DSK i ON.

U slično postavljenom eksperimentu, Rančić (2011) je utvrdila da je brzina rastenja plodova u tretmanu ON znatno veća u odnosu na tretmane DSK i RDN, ali je zbog sličnosti u dužini trajanja ekspanzije ćelija u tretmanima DSK i RDN, u tim tretmanima i veličina plodova manja u odnosu na ON biljke. Ispitivanja Pećinar (2015) su pokazala i da je maksimalna brzina rastenja ćelija ploda Ailsa Craig slična našim rezultatima, kao i dužina trajanja intervala maksimalnog rastenja.

Najznačajniji uticaj primene tretmana DSK primećen je u fazi pojave plodova karakterističnog oblika i veličine. U ovom tretmanu, plodovi prestaju sa rastenjem oko nedelju dana kasnije u odnosu na tretman ON, a oko 5 dana kasnije u odnosu na tretman RDN. Produžen period rastenja plodova u tretmanu DSK, na kraju najverovatnije utiče na veličinu plodova (53,78 mm) koja se statistički značajno nije razlikovala od ON plodova (49,50 mm). Rezultati za RDN tretman su pokazali da je prečnik plodova za oko 20% manji u odnosu na plodove ON i DSK biljaka (Tab. 8). Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim rezultatima Savić *i sar.* (2008) i ukazuju na činjenicu da je produžen period ćelijske ekspanzije značajan za dobijanje većih plodova. Rezultati ispitivanja većeg broja citoloških parametara (broja ćelija perikarpa, njihove površine, obima i prečnika) uz primenu najsavremenijih anatomskih metoda doprineli su razumevanju deobe i rastenja ćelija u okviru 7 različitih slojeva perikarpa plodova Ailsa Craig i *flacca* (Pećinar, 2015). Ovi rezultati su slično našim, pokazali da je faza eksponencijalnog rasta plodova divljeg tipa paradajza trajala oko 50% duže, a brzina rastenja ploda je za 30% bila veća nego kod genotipa *flacca*, što je rezultiralo time da su plodovi divljeg tipa imali veću svežu masu ploda (za 60%), veći prečnik ploda (za 30%), veću suhu masu ploda i veću masu perikarpa (za 70%).

Ispitivanje dinamike rastenja plodova je pokazalo i da plodovi biljaka u tretmanima DSK i RDN u približno slično vreme sazrevaju i to oko 8-9 dana kasnije nego ON biljke. Sličan trend razvića imaju i *flacca* biljke u tretmanima DSK i RDN, s tim što je prvi uticaj tretmana navodnjavanja primećen tek u fazi prestanka rastenja

plodova. Plodovi u tretmanu RDN prvi završavaju svoj porast, dok u tretmanima ON i DSK plodovi rastu još 3 i 8 dana. Sazrevanje plodova u tretmanima DSK i RDN se događa gotovo istovremeno i to oko 2 nedelje kasnije u odnosu na ON biljke.

Poznato je da sazrevanje plodova zavisi od sinteze etilena u plodovima, a smatra se da je signalni mehanizam za sintezu etilena povećanje koncentracije ABA u korenu (Jiang *i sar.*, 2000; Kojima *i sar.*, 1993), pa bi u osnovi kasnijeg sazrevanja plodova mogao da bude kašnjenje signalnog mehanizma iz korena. Iako je u korenu biljaka RDN primećena veća sinteza ABA u odnosu na DKS, Dodd *i sar.* (2008) su ustanovili da za efikasnost ABA kao hemijskog signala u tretmanu DSK nije neophodna samo sinteza ABA kao signalnog molekula u isušivanom delu korena, već je takođe neophodno da se održi nesmetani ksilemski transport vode, ABA i drugih signala od korena do nadzemnih delova biljke. Na taj način, veća količina vode u navodnjavanoj strani korenovog sistema može da poveća transport ABA iz korenovog sistema u nadzemni deo.

U literaturi postoje i podaci koji pokazuju da DSK ubrzava sazrevanje plodova paradajza. Rezultati Zegbe-Domínguez *i sar.* (2003) su pokazali da plodovi DSK biljaka brže sazrevaju u odnosu na RDN biljke i da je to, uz efikasnije korišćenje i uštedu vode, jedna od agronomskih prednosti primene DSK tehnike u proizvodnji paradajza. Razlike između naših i ovih rezultata se mogu pripisati manjoj ukupnoj količini vode koja je upotrebljena u DSK ogledima (50%), u odnosu na naš eksperimentalni sistem (70%), kao i genotipskim razlikama između ispitivanih sorti paradajza.

I kod Ailsa Craig i kod *flacca* RDN je u značajnoj meri redukovao masu plodova (Tab. 8). Ono po čemu se razlikuju je da je kod *flacca* DSK tretman redukovao suvu, ali ne i svežu masu plodova. Analiza učešća ispitivanih organa u ukupnoj svežoj i suvoj masi biljke je pokazala da je kod Ailsa Craig biljaka RDN tretman smanjio za oko 10% učešće mase plodova u odnosu na ON i DSK, dok se istovremeno povećalo učešće biomase listova. Ispitivanja kod *flacca* biljaka nisu pokazala značajan uticaj tretmana na distribuciju biomase. Međutim, kod mutanta *flacca* jasno je uočen trend povećanja procentualnog učešća sveže vegetativne biomase u odnosu na biomasu ploda kod svih tretmana u odnosu na Ailsa Craig.

Iako u našim ogledima nije ispitivano usvajanje i transport vode i asimilata, kao ni sinteza asimilata u procesu fotosinteze, odnosi suve mase koren/izdanak i

plodovi/izdanak (Tab. 4 i 5) mogu da ukažu na to da li je suša usporila ili smanjila transport asimilata ka plodovima. Smanjen odnos plodovi/izdanak kod RDN biljaka (1,23) u odnosu na ON i DSK tretmane (2,06 i 2,28) ukazuje da je RDN tretman kod Ailsa Craig uticao na preraspodelu asimilata i to tako da je smanjen transport asimilata od stabla i listova ka plodovima. To je verovatno jedan od uzroka njihove manje mase u odnosu na ON plodove. Kod *flacca*, međutim, ovaj se trend nije pojavio ali su zato rezultati za odnos koren/izdanak ukazali da je RDN tretman imao veći uticaj na rastenje korena nego na rastenje izdanka. Iz ovakve analize se može zaključiti i da je smanjeno rastenje i apsorpciona površina korena kod RDN biljaka (na osnovu biomase) direktno uticala na manje i sporije usvajanje vode kod *flacca* biljaka, na šta indirektno ukazuju i rezultati promene sadržaja vode u supstratu gde su biljke gajene.

6.4. Prinos biljaka i efikasnost usvajanja vode

Prema rezultatima naših istraživanja, kod genotipa Ailsa Craig, tretman DSK je imao uticaj na redukciju broja plodova po biljci. Međutim, zbog produženog perioda intenzivnog rastjenja ćelija, prečnik plodova na kraju eksperimenta nije imao značajne razlike u odnosu na veličinu ploda optimalno navodnjavanih biljaka, čak su se formirali plodovi sa malo većim prečnikom (za 8,6%) u odnosu na plodove iz ON tretmana. Ukupan prinos (izražen i kao sveža i suva masa plodova po biljci) se nije statistički značajno razlikovao između ova dva tretmana (Tab. 8). Sveža masa ploda u ovim tretmanima je iznosila: 2180,46 g/biljci (ON) i 2129,96 g/biljci (DSK), a suva masa 149,37 g/biljci (ON) i 125,56 g/biljci (DSK).

Veličina plodova paradajza takođe zavisi i od akumulacije vode od strane biljke, jer voda sačinjava oko 95% ukupne sveže mase (Ho, 1992). Rezultati Freitas *i sar.* (2011) pokazuju da je povećanje ukupne mase plodova u zavisnosti od količine ABA. Zbog toga može da se pretpostavi da zbog produženog perioda rastjenja ćelija u tretmanu DSK, dolazi do veće akumulacije vode u plodovima kod biljaka u tretmanu DSK, pa samim tim i do povećanja sveže mase i prinosa. To može da utiče i na akumulaciju skroba koji čini 20% suve mase ploda paradajza (Ho *i sar.*, 1983), a takođe i na metabolizam saharoze i transport ugljenih hidrata u plodove, koji je u pozitivnoj korelaciji sa brzinom rastjenja plodova (Wang *i sar.*, 1993).

Naši rezultati su pokazali i da je u tretmanu RDN, došlo do značajne redukcije broja plodova po biljci u odnosu na tretman ON, ali su se i zbog manje brzine rastjenja plodova obrazovali plodovi sa manjim prečnikom i manjom svežom masom (1523,99 g/biljci) i suvom masom (100.26 g/biljci), što je direktno rezultiralo i za oko 30% manjim prinosom (Tab. 8).

Sličan trend je imao i uticaj ispitivanih tretmana kod *flacca* mutanta na biomasu plodova (Tab. 8). Rezultati za svežu masu su bili: 521,57 g/biljci (ON), 429,98 g/biljci (DSK) i 328,32 g/biljci (RDN), dok su za suhu masu iznosili 41,59 g/biljci (ON), 26,81 g/biljci (DSK) i 21,63 g/biljci (RDN). DSK tretman je uticao na redukciju broja plodova po biljci, ali nije imao uticaj na konačnu veličinu plodova i njihov prinos, dok se statistički značajna razlika javila samo između ON i RDN.

U literaturi postoji dosta različitih podataka o uticaju delimičnog sušenja korenova na prinos paradajza. Neki literaturni podaci pokazuju da se upotrebom tehnike navodnjavanja DSK prinos paradajza ne menja u odnosu na tretman ON, pa čak i malo povećava, kako kod paradajza koji se koristi za industrijsku preradu (Zegbe-Domínguez *i sar.*, 2003; Zegbe *i sar.*, 2006a; Zegbe *i sar.*, 2004; Zegbe *i sar.*, 2006b), tako i kod paradajza koji se koristi u svežem stanju (Kirda *i sar.*, 2004). Nasuprot tome, postoje podaci koji navode da primenom DSK tehnike navodnjavanja dolazi do smanjenja prinosa paradajza (Tahi *i sar.*, 2007; Topcu *i sar.*, 2007). Davies *i sar.* (2000) su takođe ispitali efekat DSK tretmana na Ailsa Craig genotip. Njihov zaključak je da iako ne postoji statistički značajna razlika između broja plodova po biljci, primena DSK tretmana navodnjavanja značajno smanjuje ukupnu svežu masu plodova i ukupan prinos u odnosu na ON, ali ne i suhu masu plodova. Ipak, treba napomenuti da se postavke ovih i naših eksperimenata razlikuju. Davies *i sar.* (2000) su za DSK tretman upotrebili 50% vode od tretmana ON, dok je u našem eksperimentalnom sistemu za DSK utrošeno više vode (70%). Sličan trend se ispoljio i u rezultatima Savić *i sar.* (2008) koji su ispitivanja obavili sa drugim genotipom paradajza (Sunpak). Prema njihovim rezultatima uslovi vodnog deficita smanjuju ukupan prinos plodova po biljci.

Ove razlike se mogu objasniti već istaknutim mogućim razlikama koje nastaju usled toga kako se primenjuje DSK tehnika (upotrebljena količina vode i promena strane zalivanja), koliko dugo traje ogled, a može se pripisati i genotipskim razlikama. Može se pretpostaviti da korišćenje veće količine vode za navodnjavanje kod DSK

tretmana, dovodi do toga da koren lakše detektuje promenu u sadržaju vode u zemljištu, što olakšava sintezu i ubrzava transport hemijskih signala. Ova pretpostavka je u skladu sa onom koju su predložili Tardieu *i sar.* (1992). Po njima, količina pristupačne vode u zemljištu je značajnija za biljke izložene suši, nego ukupni potencijal vode u zemljišta. Pored toga, Dodd *i sar.* (2008) su ustanovili da za efikasnost hemijskih signala u tretmanu DSK nije neophodna samo sinteza ABA signala u isušivanom delu korena, već je takođe neophodno da se održi nesmetano usvajanje vode od korena, preko ksilema do izdanka i plodova. Rezultati Dodd (2007) su pokazali i da na rezultate DSK tretmana može da utiče heterogenost zemljišta ili supstrata u kome se biljke gaje, a koje sa svoje strane može da utiču na sintezu i akumulaciju ABA u korenu kao signala suše.

Na transport asimilata i metabolita između stabla ili listova i plodova može indirektno da ukaže i odnos mase listovi/plodovi ili stablo i listovi/plodovi (Hansen, 1971). Naši rezultati merenja suve i sveže mase kod biljaka u tretmanu DSK mogu takođe biti objašnjeni i tzv. source/sink odnosom ili odnosom između organa koji su snabdevači sa asimilatima i organa koji su korisnici asimilata. Veličina ploda i njegovo rastenje zavise od raspoloživih asimilata (Fanwoua *i sar.*, 2013). U prvim fazama razvika rastenje plodova zavisi od usvajanja metabolita, vode i minerala iz okolnih organa. Većina metabolita se transportuje iz listova (najčešće u formi saharoze koja se razlaže do heksoza), ali fotosinteza u mladim plodovima (koji imaju hloroplaste) takođe može da doprinese razviću ploda i posebno obrazovanju semena (Lytovchenko *i sar.*, 2011). Davies *i sar.* (2000) su izneli hipotezu po kojoj na konačan prinos plodova DSK biljaka takođe utiče odnos source/sink organa. Ovaj odnos uslovljava transport asimilata od listova ka plodovima paradajza DSK biljaka. Naši rezultati pokazuju da se kod RDN biljaka povećalo učešće vegetativnih organa u ukupnoj biomasi biljaka u odnosu na DSK i ON biljke. Stoga se može pretpostaviti i da je smanjen odnos biomase listova i plodova kod RDN biljaka (1,23) u odnosu na uzajamni odnos kod ON biljaka (2,06) usporio transport asimilata ka plodovima. To bi takođe mogao biti jedan od uzroka manjeg prinosa kod ovih biljaka u odnosu na optimalno navodnjavane i DSK biljke (Tab. 8).

Na osnovu poređenja distribucije ukupne biomase u vegetativnim organima i plodu ON, DSK i RDN biljaka može se pretpostaviti da je povećanje učešća biomase

vegetativnih organa u tretmanu DSK izazvalo relativno veći odnos sink/source organa u odnosu na RDN tretman. Shodno tome, asimilati i voda su preusmereni od listova.

Ispitivanja efikasnosti korišćenja vode (WUE) su takođe pokazala razlike između ispitivanih tretmana i genotipova. Kod genotipa Ailsa Craig, efikasnost korišćenja vode (WUE) značajno se povećala u tretmanima DSK i RDN (za 69,1% i 73,7%) u odnosu na ON biljke (Tab. 8), dok je kod *flacca* mutanta WUE bila značajno veća samo u tretmanu RDN (za 42,9%).

Slični rezultati tretmana DSK na WUE su ustanovljeni u mnogim ogledima kod većeg broja biljnih vrsta. Kod paradajza, u tretmanu DSK gde je primenjivano 50% vode od tretmana ON, utvrđeno je povećanje WUE u odnosu na tretman ON za 56% (Kirda *i sar.*, 2004), 59% (Stikić *i sar.*, 2003) 64% (Lei *i sar.*, 2009), 70% (Davies *i sar.*, 2000; Zegbe *i sar.*, 2004), pa čak i 200% (Zegbe-Domínguez *i sar.*, 2003) i kod vinove loze za 80% (Santos *i sar.*, 2003). Generalno se smatra da je u osnovi povećanog WUE u tretmanima DSK, efekat ABA kao hemijskog signala koji se transportuje iz korena i deluje na stomine ćelije tako što smanjuje njihovu otvorenost i tako redukuje transpiraciju biljaka, kao i na redukciju rastenja ćelija listova. Oba procesa, redukcija transpiracije i rastenja listova doprinose uštedi vode i povećanju efikasnosti u njenom korišćenju. Na ulogu ABA ukazuju rezultati Rodrigues *i sar.* (2008) u ogledu sa vinovom lozom, koji su pokazali da u tretmanu DSK dolazi do povećanja ksilemske ABA i delimičnog zatvaranja stoma. Povećanu koncentraciju ksilemske ABA u DSK tretmanu i njen uticaj kao signalnog molekula na veću zatvorenost stoma u odnosu na ON biljke ustanovili su i drugi autori kod biljaka paradajza (Dodd *i sar.*, 2006; Dodd, 2007; Kudozarova *i sar.*, 2007), suncokreta (Dodd *i sar.*, 2008) i krompira (Liu *i sar.*, 2006). Pri tome delimična redukcija otvorenosti stominih ćelija ne utiče u značajnoj meri na fotosintezu, kao što su pokazali rezultati Savić *i sar.* (2008) kod paradajza i Liu *i sar.* (2006b) kod krompira.

Kod *flacca* mutanta je ustanovljen pozitivan efekat DSK tretmana na efikasnost usvajanja vode, ali ovaj efekat, zbog varijabilnosti podataka, nije bio statistički značajan. Statistički značajan efekat se ispoljio kod RDN tretmana jer je u toku tog tretmana za 33% utrošeno manje vode u odnosu na ON.

Naši rezultati potvrđuju druge literaturne podatke po kojima se primenom DSK tehnike mogu značajno smanjiti količine upotrebljene vode za navodnjavanje, a da se

pri tome značajno ne umanju prinos. Iako RDN tretman zbog manje količine vode povećava WUE, nedostatak ove tehnike je što redukuje prinos. Primena DSK tehnike može biti od posebnog značaja za poljoprivrednu proizvodnju u onim regionima gde suša u značajnoj meri smanjuje prinos, a količine raspoložive vode za navodnjavanje su nedovoljne. Optimalna primena ove metode, međutim, podrazumeva kontrolu vodnog režima zemljišta i biljaka i u skladu sa tim promenu strane navodnjavanja. To je neophodno da ne bi došlo do sušenja korena u nezalivanoj strani (Jovanović i Stikić, 2012).

6.5. Biohemijski mehanizmi regulacije rastenja plodova

Biohemijski analiza rastenja plodova je obavljena na osnovu rezultata merenja hormona abscisinske kiseline (ABA) i enzima peroksidaze ćelijskog zida u sva 3 tretmana (ON, DSK i RDN), kao i proteomik analize u plodovima ON i DSK biljaka.

Akumulacija ABA u plodovima

U našim ispitivanjima je merena količina ABA u perikarpu plodova Ailsa Craig i *flacca* biljaka. Iako je poznato da se u toku sazrevanja plodova menja količina ABA, njena uloga, kao i uloga drugih hormona u razviću i sazrevanju plodova, još uvek nije u potpunosti razjašnjena (Setha i sar., 2004).

U literaturi postoje različiti podaci o sadržaju ABA u plodovima u različitim fazama razvića. Prema Gillaspay i sar. (1993) koncentracija endogene ABA u plodovima paradajza dostiže maksimum u fazi intenzivnog rastenja ćelija. Visoka koncentracija endogene ABA je takođe izmerena u toku ranih faza rastenja plodova drugih vrsta poput jabuke, trešnje, citrusa i vinove loze i smatra se da može imati važnu funkciju u regulaciji rastenja ploda (Kojima, 1996; Smith i sar., 1995). U lokulima i semenima ploda paradajza izmerena koncentracija ABA je najveća između 45 i 55 dana nakon cvetanja, a nakon toga opada (Kojima i sar., 1993). Postoje podaci da se ABA postepeno povećava u toku rastenja plodova paradajza i da svoj maksimum dostiže u fazi prestanka intenzivnog rastenja plodova (Abdel-Rahman i sar., 1975). Neki podaci ukazuju na to da se količina ABA u plodovima naglo povećava sa završetkom rastenja i promenom boje ploda i da je glavni inicijator za početak sinteze etilena (Jiang i sar., 2000; Zhang i sar., 2009). Karakteristika klimakteričnih plodova, u koje spada i

paradajz, je da se u toku sazrevanja plodova povećava proces disanja i biosinteza etilena koji je i glavni regulator zrenja (Abdel-Rahman *i sar.*, 1975; Carrari i Fernie, 2006; Gillaspay *i sar.*, 1993). Moguće je da maksimalna koncentracija ABA u plodovima utiče na početak produkcije etilena koja prati sazrevanje plodova, jer egzogeno dodata ABA pospešuje sintezu etilena kod jabuke, jagode i paradajza (Buta i Spaulding, 1994; Zhang *i sar.*, 2009). Pored toga, ulogu ABA u zrenju plodova su potvrdili i drugi autori (Jia *i sar.*, 2011; Sheng *i sar.*, 2008; Zhang *i sar.*, 2009), koji su došli do zaključka da tretman inhibitorima sinteze ABA smanjuje i sintezu etilena, što se odražava na odloženo zrenje plodova. Setha *i sar.* (2004) su utvrdili i da se sa sazrevanjem plodova povećava i koncentracija endogene ABA kod jabuke i trešnje.

U našim istraživanjima plodova Ailsa Craig, uočeno je postepeno opadanje koncentracije ABA u svim tretmanima do 45. dpa, što se poklapa sa početkom sazrevanja plodova (Sl. 22A i Tab. 9). Između tretmana ON i DSK, nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji ABA u svim ispitivanim fazama razvića. Međutim, ipak je bila uočljiva veća koncentracija ABA u tretmanu ON, koja je najizraženija u fazama 30. i 45. dpa i to za 30% (Tab. 9). Moguće je da je niža koncentracija ABA u tretmanu DSK imala uticaj na duži period rastenja plodova, ali i kasniji početak sazrevanje plodova u odnosu na ON, jer je bio potreban duži period da se ABA akumulira u plodovima.

Rezultati Freitas *i sar.* (2011) pokazuju da je povećanje ukupne mase plodova u zavisnosti od količine ABA. Zbog toga može da se pretpostavi da je zbog produženog perioda rastenja ćelija u našem tretmanu DSK, došlo do veće akumulacije vode i asimilata u plodovima kod ovih biljaka, pa samim tim i do povećanja sveže mase i prinosa. U tretmanu RDN u početku je izmerena veća koncentracija ABA u perikarpu plodova, što je verovatno direktan uticaj suše i može da objasni usporeno rastenje plodova i konačan manji prečnik i masu plodova (Tab. 8).

Sličan trend opadanja ABA je utvrđen i kod *flacca* mutanta (Sl. 22B). Najveća koncentracija ABA u najdužem periodu razvića plodova je izmerena u tretmanu RDN (Tab. 9), što je verovatno uticalo na konačan, manji prečnik plodova ovih biljaka. U tretmanima ON i DSK, trend promene ABA je bio dosta sličan. Na kraju ogleda nisu utvrđene statistički značajne razlike u veličini plodova između ova dva tretmana.

Očekivano, utvrđena je i značajna razlika u koncentraciji ABA između Ailsa Craig i *flacca* biljaka. Prosečna koncentracija ABA u plodovima *flacca* biljaka je bila 38% od koncentracije u plodovima Ailsa Craig, a istovremeno plodovi *flacca* biljaka su bili značajno manji (Tab. 8). Rezultati Nitsch *i sar.* (2012) su takođe pokazali da je smanjena količina ABA u plodovima *flacca* i *notabilis* ABA mutanata dovela do obrazovanja manjih plodova, ali da mala koncentracija ABA u plodovima nije bila u korelaciji sa promenama u koncentraciji auksina, već sa obrazovanjem etilena. To je takođe potvrdilo hipotezu da kod divljeg tipa akumulacija ABA utiče na rastenje ćelija preko negativnog efekta na sintezu etilena. Ovakav antagonistički efekat ABA i etilena može da objasni i zbog čega su plodovi *flacca* biljaka u našim eksperimentima bili značajno manji od plodova divljeg tipa (Ailsa Craig). Međutim, treba imati u vidu i da postoje rezultati koji ukazuju i da ABA ima i nezavistan od etilena efekat na rastenje ili na osetljivost tkiva na etilen (Dodd *i sar.*, 2009).

Treba istaći i da najnoviji rezultati ispitivanja uloge hormona u toku formiranja, rastenja i sazrevanja plodova, kao i genske regulacije njihove sinteze i akumulacije, ukazuju da su auksini, giberelini, citokinini primarni regulatori formiranja plodova, da auksini i citokinini regulišu rastenje, a ABA i etilen sazrevanje plodova (Kumar *i sar.*, 2014). Međutim, naša istraživanja nisu obuhvatila merenja koncentracije drugih hormona, sem ABA u plodovima. Od posebnog značaja za razumevanje procesa rastenja i razvića plodova u našim eksperimentalnim uslovima bila bi ispitivanja etilena čiji interakcijski odnosi bi mogli značajno da doprinesu objašnjenju efekata DSK i RDN na plodove paradajza.

Peroksidaza

U našim istraživanju, generalno posmatrano, porast u aktivnosti jonski vezane peroksidaze ćelijskog zida korespondira sa prestankom rastenja i početkom sazrevanja plodova (Tab. 10 i Sl. 25). Poznato je da peroksidaze ćelijskog zida aktivno učestvuju u procesima rastenja. One smanjuju ekstenzibilnost zida tako što katališu oksidaciju fenola stvarajući difenolne mostove između polimera. To vodi vezivanju ugljenih hidrata i glikoproteina u ćelijskom zidu (Fry, 1986; Hatfield *i sar.*, 1999; MacAdam *i sar.*, 1992; Passardi *i sar.*, 2004). Uloga peroksidaza u zoni rastenja gde ćelije rastu je da kada se formira novi zid “zaključa zajedno” celulozne mikrofibrile i spreči njihovo

rastezanje. Sa druge strane peroksidaza u zoni diferenciranih ćelija učestvuje u metabolizmu lignina i tako potpomaže stvaranje sekundarnog zida (Stikić i Jovanović, 2015).

Prema Aganchich *i sar.* (2007) porast u aktivnosti peroksidaza u uslovima stresa suše može da predstavlja adaptivnu reakciju na sintezu aktivnih oksidativnih supstanci i slobodnih radikala koji nastaju kao rezultat sušom indukovano oksidativnog stresa (Sofo *i sar.*, 2004; Sofu *i sar.*, 2005; Smirnov, 1993). Pored njene antioksidativne funkcije, porast u aktivnosti peroksidaza može da dovede do promene u mehaničkim osobinama ćelijskog zida, indukujući lignifikaciju i izazivajući inaktivaciju auksina, što dovodi do obustavljanja rastezanja i što je u korelaciji sa adaptacijom biljaka na sušu (Sofo *i sar.*, 2005). Rezultati istraživanja većeg broja autora su pokazali i da peroksidaza ćelijskog zida ima ulogu u biohemijskoj inhibiciji rastezanja ćelija lista i ploda u suši (Bacon *i sar.*, 1997a; Đaković i Jovanović, 2003; Jovanović *i sar.*, 2004; Savić *i sar.*, 2008; Vucelić Radović *i sar.*, 2008).

Istraživanja Thompson (2001) su pokazala da pH ploda ima značajan uticaj na istežanje i plastičnost ćelijskog zida ploda paradajza i da je optimalna vrednost pH oko 5.0. Moguće je da povećanje pH ima ulogu u regulaciji rastezanja ćelija preko efekta na aktivnost enzima ćelijskog zida ili na redistribuciju ABA kao što su ukazali rezultati Savić *i sar.* (2008). Rezultati Ismail i Phizackerley (2009) su pokazali i da peroksidaza može da učestvuje u redukciji rastezanja u toku sazrevanja plodova biljaka gajenih u uslovima delimičnog navodnjavanja korenova.

Kod genotipa Ailsa Craig razlike u aktivnosti peroksidaze između tretmana ON i DSK započinju od 20. dpa kada aktivnost peroksidaze u plodovima ON biljaka počinje naglo da raste da bi najveću aktivnost dostigla u fazi 45. dpa (od 0,62 HRPEU/g sveže mase do 6,96 HRPEU/g sveže mase). Nagli skok u aktivnosti enzima kod DSK plodova započinje nešto kasnije u fazi 30. dpa (od 1,52 HRPEU/g sveže mase) i duže traje tako da su najveće vrednosti aktivnosti enzima izmerene na kraju ispitivanog perioda (5,27 HRPEU/g sveže mase). Poređenja rezultata enzimske aktivnosti sa dinamikom rastezanja plodova su pokazala da porast aktivnosti enzima u oba tretmana započinje sa fazom u toku koje je brzina rastezanja dostigla svoj maksimum, dok se maksimumi aktivnosti poklapaju sa periodom kada su plodovi završili svoje rastezanje (Sl. 26A i B). Ono što je takođe uočljivo je i da sporije rastezanje i duži period porasta aktivnosti enzima odgovara

dužem periodu rastenja plodova. Može se pretpostaviti da je duže i sporije rastenje DSK plodova u odnosu na ON plodove rezultat nižih maksimalnih vrednosti aktivnosti peroksidaze i njenog sporijeg porasta. Takođe se može pretpostaviti i da je to rezultiralo time da su plodovi u tretmanu DSK na kraju dostigli čak nešto malo veći prečnik od plodova ON biljaka, iako im je brzina rastenja bila manja.

Dinamika promene aktivnosti enzima RDN plodova je slična promeni aktivnosti kod ON plodova, ali u mnogo manjem obimu (Sl. 26C). Kod plodova ON i RDN biljaka porast aktivnosti peroksidaze započinje u periodu kada su plodovi dostigli maksimalnu brzinu rastenja (20. dpa), zatim aktivnost raste sa opadanjem brzine rastenja plodova da bi maksimum porasta dostigla u fazi kada plodovi prekidaju sa rastenjem (45. dpa) i potom sledi faza opadanja aktivnosti. Razlika u tretmanima se ispoljila u izmerenim vrednostima enzima i to posebno u početnim merenjima. U plodovima iz tretmana RDN, skoro duplo veća aktivnost peroksidaze u odnosu na tretmane ON i DSK izmerena je na početku merenja (u fazi 15. dpa, 0.91 HRPEU/g sveže mase). Ti rezultati možda mogu i da objasne manju brzinu rastenja ovih plodova u odnosu na plodove ON i DSK biljaka.

Dinamika promene aktivnosti peroksidaze u plodovima *flacca* mutanta je slična dinamici promene aktivnosti u svim tretmanima kod Ailsa Craig plodova (Tab. 10, Sl. 25B). Razlike se ispoljavaju u aktivnosti enzima koja je mnogo manja (min 0,28 HRPEU/g sveže mase do max. 2,17 HRPEU/g sveže mase) u odnosu na izmerene vrednosti kod Ailsa Craig (min 0,40 HRPEU/g sveže mase do max. 6,96 HRPEU/g sveže mase). Dinamika promene aktivnosti enzima prati dinamiku rastenja plodova (Sl. 27). Takođe treba istaći i da se u plodovima DSK biljaka oba genotipa aktivnost peroksidaze nastavlja i u fazi 60. dpa kada je rastenje plodova završeno.

Poznato je da za vreme sazrevanja plodova nastaju promene u ćelijskom zidu koje utiču na formiranje novih izoenzima peroksidaze (Andrews *i sar.*, 2002; Andrews *i sar.*, 2000; Thompson *i sar.*, 1998; Vicente *i sar.*, 2007). De Souza i MacAdam (1998) su pomoću izoelektričnog fokusiranja identifikovali nekoliko izoformi peroksidaze sa različitim optimumima pH, pri čemu su u homogenatu lista konstatovali aktivnost i kiselih i baznih izoformi koje se sve izoluju i identifikuju pomoću gvajakol testa, ali koje nemaju istu ulogu u rastenju ćelija. Rezultati Savić *i sar.* (2008) i Vucelić Radović *i sar.* (2008) su ukazali da peroksidaza može da igra različitu ulogu i to tako što kod

RDN plodova utiče na redukciju procesa rastenja (usporava izduživanje ćelija), a kod DSK i verovatno, ON plodova pospešuje sazrevanje plodova. To bi moglo da objasni i naše rezultate jer u tretmanu DSK od momenta kada plodovi dostignu svoj tipičan oblik i veličinu do zrenja prođe period od oko 4-5 dana, dok je u tretmanu RDN taj period znatno duži i traje 10-12 dana. Dalja istraživanja efekata peroksidaze i, posebno njenih izoformi, doprinela bi razumevanju uloge peroksidaze u procesu rastenja i razvića plodova.

Prema literaturnim podacima, aktivnost peroksidaze može da se dovede u vezu sa hormonskim statusom biljke. Rezultati Lin i Kao (2001) su pokazali da povećana koncentracija ABA prethodi povećanju u aktivnosti peroksidaza u korenu pirinča. Međutim, rezultati Andrews (2003) ukazuju na mogućnost da je povećanje u aktivnosti peroksidaza u toku sazrevanja plodova indukovano etilenom čija koncentracija raste tokom degradacije hlorofila i prilikom sazrevanja plodova. Kao što je već istaknuto, u našim istraživanjima nije merena koncentracija etilena, ali poređenja dinamike promene enzima peroksidaze i koncentracije ABA ukazuju na antagonistički efekat između aktivnosti peroksidaze i količine ABA u perikarpu plodova u svim tretmanima i kod oba ispitivana genotipa (Sl. 28 i 29). U literaturi ne postoje rezultati koji se odnose na uzajamne odnose ABA, etilena i peroksidaze, tako da bi buduća istraživanja morala biti bazirana na ovim ispitivanjima. To bi bilo od posebnog značaja za objašnjenje rastenja plodova kod ABA deficitarnog mutanta *flacca*.

Proteomik analiza

Zbog boljeg razumevanje efekta tretmana DSK na rastenje ćelija plodova paradajza, urađena je proteomik analiza i to kod plodova starih 15. dpa i 30. dpa. Plodovi starosti 15. dpa su u fazi intenzivnog rastenja ćelija i ubrzanog povećanja ćelijske zapremine, a plodovi starosti 30. dpa su u fazi početka sazrevanja plodova. Kod genotipa Ailsa Craig, analizirani su efekti faze razvoja (15. i 30. dpa) i efekti tretmana (ON i DSK) na razlike u regulaciji sinteze proteina. Pored toga, urađeno je i poređenje efekta tretmana (ON i DSK) u fazi 30. dpa između dva posmatrana genotipa (Ailsa Craig i mutanta *flacca*). Zbog malog broja i sitnih plodova kod *flacca* mutanta, nije bilo dovoljno uzorka za analizu efekta tretmana u fazi 15. dpa između genotipa Ailsa Craig i *flacca*.

Metabolizam ugljenih hidrata

Naši rezultati pokazuju da proteini koji imaju udela u metabolizmu ugljenih hidrata uglavnom pokazuju smanjenu sintezu u tretmanu DSK u odnosu na tretman ON i to u obe faze razvića plodova. Utvrđena je i smanjena akumulacija više proteina kod starijih plodova. Sa druge strane, analizom efekta faze razvića plodova u tretmanima DSK i ON, povećana akumulacija većine proteina je primećena u starijim plodovima (30. dpa) kod oba tretmana. Ovi rezultati poređenja faze razvića plodova su u skladu sa rezultatima Faurobert *i sar.* (2007b) koji su pokazali da većina proteina sa funkcijom u metabolizmu ugljenih hidrata ima povećanu ekspresiju u starijim fazama razvića plodova, a maksimum dostižu u zrelim plodovima. Kod *flacca* mutanta, kod većine proteina nije primećena značajna razlika između posmatranih tretmana u fazi 30. dpa. U odnosu na Ailsa Craig, kod *flacca* plodova u tretmanu ON većina proteina je akumulirana u manjoj količini, dok je u DSK tretmanu količina većeg broja proteina jednaka kod oba genotipa.

Većina proteina iz ove grupe ima funkciju u primarnom metabolizmu ugljenih hidrata, što podrazumeva procese glikolize i ciklus trikarboksilnih kiselina. Kod genotipa Ailsa Craig, u 30. dpa utvrđeno je da je nekoliko enzima imalo povećanu ekspresiju u oba tretmana u odnosu na 15. dpa. Dihidrolipoamid-dehidrogenaza (tačka 48) i piruvatdehidrogenaza (tačka 37) sačinjavaju multienzimski kompleks koji transformiše piruvat u acetil Co-A i povezuje proces glikolize sa ciklusom trikarboksilnih kiselina. Oba enzima imaju smanjenu ekspresiju u tretmanu DSK u odnosu na ON. Takođe je primećena i njihova smanjena sinteza kod *flacca* plodova u odnosu na Ailsa Craig u tretmanu ON. Ipak, u ogledu sa paradajzom u kom je izazvan stres soli (Manaa *i sar.*, 2011), piruvat-dehidrogenaza je imala povećanu ekspresiju u korenu tretiranih biljaka, ali je njena ukupna količina bila slična kao i kod DSK i tretmana ON. Imajući u vidu da je efekat interakcije između tretmana i faze razvića veoma značajan, ovaj rezultat ne bi trebao da bude posledica tretmana.

Glikoliza je veoma značajan proces za tkiva koja rastu jer se njeni intermedijeri mogu koristiti za sintezu niza jedinjenja kao što su: fenilpropanoidi, izoprenoidi, amino ili masne kiseline (Voll *i sar.*, 2009). Naši rezultati su pokazali smanjenu sintezu većine proteina koji imaju funkciju u glikolizi u plodovima DSK biljaka. Dve tačke, koje zapravo predstavljaju isti protein, imaju različitu regulaciju i identifikovane su kao

enolaza. Za enolazu (tačka 9) je utvrđena smanjena sinteza u tretmanu DSK u odnosu na ON i kod *flacca* mutanta, u odnosu na Ailsa Craig u tretmanu ON. Nasuprot tome, za enolazu identifikovanu kao tačku 33 je utvrđena povećana sinteza u DSK tretmanu u 15. dpa kod Ailsa Craig; kod *flacca* u odnosu na Ailsa Craig u oba posmatrana tretmana, kao i kod ON *flacca* biljaka u odnosu na DSK. Iz literature se zna da ovaj enzim ima funkciju signalnog molekula u uslovima dejstva mnogih stresnih faktora spoljašnje sredine, kao što su stres soli, suše, hladnoće i anaerobni stres i to kod mnogih biljnih vrsta (Riccardi *i sar.*, 1998; Umeda *i sar.*, 1994; Yan *i sar.*, 2005). Takođe može da deluje i kao pozitivan regulator nekih stresom indukovanih gena (Lee *i sar.*, 2002). S obzirom da naša analiza nije obuhvatila zrele plodove, moguće je da je utvrđena redukcija samo jednog proteina (enolaza, tačka 33) u ON plodovima prolaznog karaktera. Zbog toga je teško objasniti metaboličke posledice utvrđenih promena ovog enzima.

Carrari i Fernie (2006) su detaljnom analizom metaboličke regulacije razvića plodova paradajza otkrili da se glikoliza značajno povećava pre početka sazrevanja plodova zajedno sa povećanjem biosinteze etilena. Takav metabolički trend podržavaju naši rezultati u kojima je utvrđena povećana količina dva enzima iz metabolizma ugljenih hidrata i to: triazafofat-izomerase (tačka 56) i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (tačka 58) u fazi 15. dpa. Takođe je utvrđeno i značajno povećanje i u 30. dpa fazi kod oba tretmana i oba genotipa. Povećanje sinteze ovih enzima u toku rastenja ploda je značajno za porast metaboličkog fluksa u glikolizi, koji je značajan za sintezu ATP i etilena, neophodnih za sazrevanje plodova.

Od ostalih proteina metabolizma ugljenih hidrata, izdvaja se acid-beta fruktofuranozidaza (tačka 23). Ovaj enzim razlaže saharozu na glukozu i fruktozu, koji su izvori energije i ugljenika, neophodni za rastenje tkiva. Pored toga imaju funkciju u povećanju osmotskog potencijala i ulogu u izduživanju ćelija i rastenju biljaka (Sturm, 1999). Rezultati naših oglada su pokazali i da kisela beta fruktofuranozidaza ima smanjenu ekspresiju u 30. dpa kod plodova u tretmanu DSK u odnosu na ON kod genotipa Ailsa Craig, kao i kod *flacca* plodova u tretmanu ON u odnosu na Ailsa Craig. Ova razlika može da bude u osnovi sporijeg povećanja ćelija plodova u tretmanu DSK i *flacca*. Pored ovog, još četiri proteina, čija je uloga u procesu glikolize, pokazala su smanjenu ekspresiju u tretmanu DSK i kod *flacca* plodova u 30. dpa u odnosu na biljke

u tretmanu ON. To su: piruvat-kinaza izoenzim G (tačka 16), dve izoforme gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (tačke 28 i 58) i trioza-fosfat-izomeraza (tačka 56).

Acetoacil-CoA tiolaza je neophodan za izgradnju C lanca jer katališe tiolitičko razlaganje acetoacil-CoA i reversnu kondenzaciju acetil-CoA (Dyer *i sar.*, 2009). Ovaj enzim (tačka 44) je pokazao smanjenu ekspresiju u DSK plodovima faze 15. dpa u odnosu na ON plodove u istoj fazi. Ketoacil-ACP sintetaza (tačka 19) je protein odgovaran za sintezu masnih kiselina jer katališe porast ugljenikovog lanca (Siggaard-Andersen *i sar.*, 1991). Rezultati su pokazali i da je ovaj protein takođe imao smanjenu ekspresiju kod DSK plodova, u odnosu na ON plodove i to u obe ispitivane faze razvića, kao i kod *flacca*. Ovi rezultati ukazuju da je smanjen metabolički fluks u tretmanu DSK u odnosu na ON, što možda može da objasni sporiju dinamiku rastenja plodova u tretmanu DSK i *flacca* u odnosu na ON biljke.

Teško je porediti rezultate iz ovog oglada, gde je primenjena DSK tehnika navodnjavanja, sa drugim literaturnim podacima jer se u dosadašnjim ispitivanjima uglavnom izučavala klasična suša ili stres soli. Pored toga, do sada nije rađena proteomik analiza mutanta *flacca*. Poznato je da se metabolizam ugljenih hidrata veoma brzo normalizuje posle stresa soli. U većini istraživanja, koja su postavljena kao kratkotrajni eksperimenti u kojima se ispituje stres soli ili osmotski stres, primećena je smanjena ekspresija gena iz metabolizma ugljenih hidrata (Jiang i Deyholos, 2006; Kerepesi i Galiba, 2000; Ndimba *i sar.*, 2005; Wang *i sar.*, 1999). Nasuprot tome, rezultati Manaa *i sar.* (2011) su pokazali da duži period trajanja stresa generalno povećava sintezu proteina koji odgovaraju primarnim metaboličkim procesima kao što su: glikoliza i Krebsov ciklus, sinteza pentozo-fosfata i skroba. I pored toga, efekat tretmana DSK na proteine metabolizma ugljenih hidrata u našim ogledima pokazuje sličan trend, kao i rezultati istraživanja ostvareni u kratkoročnim eksperimentima sa osmotskim ili stresom soli.

Metabolizam aminokiselina

U kategoriji metabolizma aminokiselina, značajan efekat tretmana je utvrđen kod nekoliko enzima koji su uključeni u njihovu biosintezu. Za glutamin-sintetazu (tačka 35), koja katališe inkorporaciju neorganskog amonijaka u glutaminsku kiselinu da bi se formirao glutamin (Perez-Garcia *i sar.*, 1998), je utvrđena povećana sinteza u ranoj fazi

rastenja plodova u tretmanu DSK (15. dpa). Rezultati više autora su pokazali da ovaj enzim ima značajnu ulogu u osmotskom prilagođavanju korenova u uslovima stresa soli, ali i da ima zaštitnu ulogu za druge enzime i membrane (Ouyang *i sar.*, 2007; Yancey *i sar.*, 1982). Sa druge strane postoje i rezultati koji pokazuju da je porast u ekspresiji ovog enzima rezultat navodnjavanja korenova koji su prethodno bili izlagani suši (Bhatti *i sar.*, 2000). S-adenozilmetionin-sintetaza katališe biosintezu S-adenozil-L-metionina koji je prekursor sinteze etilena i fenilpropanoidnih komponenti ćelijskog zida. Dva izoenzima S-adenozilmetionin sintetaze (tačka 18 i 64) imala su smanjenu ekspresiju kod DSK plodova Ailsa Craig u obe faze razvića (i u 15. dpa u odnosu na 30. dpa), kao i kod *flacca* mutanta. Stoga se može pretpostaviti da je u DSK tretmanu, u fazi intenzivnog rastenja ćelije (15. dpa) i kod *flacca* plodova zbog toga došlo i do smanjena sinteze lignina i drugih sekundarnih metabolita. Citosolna cistein-sintaza (tačka 7) katališe poslednju fazu u biosintezi L-cisteina, koji može da služi za sintezu proteina ili glutaciona, a funkcioniše kao S-donor za metionin i biosintezu sekundarnih metabolita (Barroso *i sar.*, 1999). Smanjena sinteza ovog i drugih enzima koji su u vezi sa metabolizmom aminokiselina, u 30. dpa u tretmanu DSK i kod *flacca*, prate trend.

Sinteza i degradacija proteina

Identifikovano je i nekoliko enzima koji učestvuju u procesu sinteze i degradacije proteina. Među njima se cistein-proteinaza 3 (tačka 12) koja se javila u dvostruko većoj količini kod genotipa Ailsa Craig u 30. dpa u oba tretmana, u odnosu na fazu 15. dpa. Poznato je da ovaj enzim učestvuje u „programiranoj ćelijskoj smrti“ i da se javlja kao odgovor na stres. Faurobert *i sar.* (2007b) su u proteomik analizi plodova utvrdili njegovo povećanje za sve vreme razvića plodova. Smanjena ekspresija cistein-proteinaze u tretmanu DSK i kod *flacca* plodova je u skladu sa utvrđenim sporijim razvićem plodova u ovom tretmanu u odnosu na plodove u tretmanu ON. EPB1 protein prati sličan trend promene, ali u nešto manjem obimu. Smanjena sinteza subjediniće proteazoma koji je deo ATP-zavisnog multienzimskog proteinaznog kompleksa (tačka 26) u obe faze razvića ploda u tretmanu DSK, kod DSK tretmana u *flacca* plodovima, kao i kod *flacca* u odnosu na Ailsa Craig, ukazuje da je došlo do usmeravanja kataboličkih procesa u cilju očuvanja neophodne energije.

Sumpor (tačka 30) je subjedinica Mg-helataze, enzima koji je učestvuje u sintezu hlorofila. Opadanje njegove sinteze je povezano sa prelaskom hloroplasta u hromoplaste (Rocco *i sar.*, 2006), što je u skladu sa našim rezultatima, jer je njegova manja količina uočena u fazi 30. dpa kod Ailsa Craig. Kod *flacca*, u istoj fazi razvića, njegova količina je znatno veća kod oba tretmana, što podržava teoriju o sporijem razviću plodova *flacca* biljaka u odnosu na Ailsa Craig.

Proteini ćelijskog zida i energetskog metabolizma

Da bi održale homeostazis u uslovima stresa i uspostavile mehanizme odbrane, biljkama je neophodna dodatna energija. Poznato je i da suša dovodi do opadanja intenziteta fotosinteze, što rezultira i smanjenom sintezom ATP. Povećana sinteza ATP u uslovima stresa povećava i otpornost biljaka na stres (Zhang *i sar.*, 2008). Enzim ATP-sintetaza ima centralnu ulogu u sintezi ATP u hloroplastima i mitohondrijama, pa je aktivnost ovog enzima od posebnog značaja za otpornost biljaka na stres. Zhang *i sar.* (2008) su pokazali da povećana ekspresija gena za ATP-sintetazu rezultira povećanjem otpornosti na sušu kod *Arabidopsis*-a.

Dva proteina iz kategorije *energetskog metabolizma* koji učestvuju u sintezi ATP su pokazala različite nivoe ekspresije. Delta lanac ATP-sintetaze iz hloroplasta (tačka 24) je imao povećanu ekspresiju u DSK tretmanu, dok je podjedinica α ATP-sintetaze (tačka 21), kao sekretorni protein, imala smanjenu ekspresiju u tretmanu DSK u obe faze razvića. Na osnovu postojeće literature, teško je objasniti ove suprotne promene. Može da se pretpostavi da postoje povećani zahtevi za energijom od strane hloroplasta koji se u daljem toku razvića ploda transformišu u hromoplaste i koji mogu da budu kompenzovani različitim mehanizmima iz drugih ćelijskih kompartimenata (Asakura *i sar.*, 2007).

Magnezijum-zavisna rastvorljiva neorganska pirofosfataza (tačka 27) je enzim koji katališe hidrolizu neorganskog fosfata (Ppi) do 2 molekula ortofosfata (Pi) i tako obezbeđuje energiju za niz anaboličkih procesa (Du Jardin *i sar.*, 1995). U našim istraživanjima smanjena sinteza ovog enzima je utvrđena kod DSK plodova u odnosu na ON plodove, i to u ranijoj fazi razvića ploda. Smanjena sinteza ovog enzima može biti u skladu sa njegovom ulogom u anabolizmu. To odgovara već uočenom generalnom trendu smanjene sinteze proteina iz kategorije metabolizma ugljenih hidrata za plodove

DSK biljaka. Kod *flacca* mutanta statistički značajno smanjenje sinteze proteina energetskog metabolizma u odnosu na genotip Ailsa Craig, je uočeno samo u plodovima ON biljaka.

Rastenje plodova u periodu između 15. i 30. dpa je rezultat povećanja ćelijske zapremine, koji zahteva pored energije i biosinteze metabolita ćelijskog zida. Proteomik analizom uočeno je 5 proteina koji su svrstani u grupu *proteina ćelijskog zida*. Cinamil-alkohol-dehidrogenaza (CAD), tačka 14 na gelu, pripada grupi NADPH-zavisnih enzima i katališe redukciju različitih fenilpropenil aldehidnih derivata i drugih komponenata ćelijskog zida (Molina *i sar.*, 2008). Ta konverzija uključuje monoglikole koji su kasnije prekursori lignina i lignana ćelijskog zida. Prolil-4-hidroksilaza (tačka 60) katališe formiranje 4-hidroksiprolina. Prema rezultatima Molina *i sar.* (2008) CAD učestvuje u sintezi ekstenzina i njihovoj aktivnosti u toku obrazovanja ćelijskog zida. Slično tome UDP-glukoza, protein sličan transglukozilaznom proteinu (tačka 62) učestvuje u sintezi glukana, koji ima ulogu u sintezi polisaharida ćelijskog zida (Li *i sar.*, 2008). SGRP-1 protein (tačka 65) je glicinom bogat protein i pripada grupi strukturnih proteina ćelijskog zida, dok UDP-L-ramnoza sintaza (tačka 66) ima ulogu u sintezi pektinskih polisaharida ćelijskog zida. U fazi 30. dpa uočen je veći broj proteina, iz grupe proteina ćelijskog zida, koji imaju povećanu ekspresiju u odnosu na 15. dpa u tretmanu DSK. Ovo ukazuje na to da je metabolička aktivnost plodova u tretmanu DSK za vreme povećanja ćelijske zapremine orijentisana ka metabolizmu ćelijskog zida. Poređenjem efekta DSK i ON tretmana u fazi 15. dpa, skoro svi proteini iz grupe proteina ćelijskog zida u ON plodovima imaju povećanu ekspresiju u odnosu na DSK plodove, ali u fazi 30. dpa nije uočena statistički značajna razlika između tretmana, osim kod CAD proteina.

U našoj proteomik analizi nisu bili ispitivani zreli plodovi, ali je primećeno da se sinteza proteina ćelijskog zida i energetskog metabolizma generalno povećava sa zrenjem plodova. Možemo da pretpostavimo da bi sa zrenjem plodova došlo do povećane sinteze ovih proteina, jer su to procesi koji su neophodni za izduživanje ćelija. Može se pretpostaviti i da su takvi metabolički procesi omogućili DSK plodovima produžen period rastjenja što je rezultiralo većim prečnikom plodova u odnosu na ON plodove na kraju ogleda. Takođe je uočeno da je kod genotipa *flacca* bila smanjena

sinteza svih proteina ćelijskog zida u odnosu na genotip Ailsa Craig, što može da bude posledica manje veličine plodova kod *flacca*.

Antioksidativni i odbrambeni proteini

Poznato je da oksidativni stres i obrazovanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) mogu indukovati različiti abiotički i biotički stresni faktori i da oksidativni stres može da dovede do oštećenja različitih organskih jedinjenja u ćeliji, uključujući lipide, proteine ili nukleinske kiseline. Odbrambeni mehanizmi obuhvataju različite antioksidativne enzime ili antioksidativna jedinjenja. Kod antioksidativnih enzima, superoksid-dismutaze (SOD) učestvuju u tzv. prvoj liniji odbrane od oksidativnog stresa, jer prevode superoksid u manje toksičan molekul vodonik peroksid. Askorbat-peroksidaze (APX), glutation peroksidaze i katalaze zatim vrše detoksikaciju vodonik peroksida (Foyer i Noctor, 2005).

Kao što je već istaknuto brojni rezultati su pokazali da je uloga antioksidativnog enzima peroksidaze (frakcije vezane za ćelijski zid) od posebnog značaja u kontroli rastjenja ćelija različitih biljnih vrsta (Bacon *i sar.*, 1997a; Jovanović *i sar.*, 2004; Thompson *i sar.*, 1998). Naši prethodni rezultati (Savić *i sar.*, 2008), kao i prethodno predstavljeni rezultati, su pokazali da se aktivnost peroksidaze ćelijskog zida povećava za vreme usporavanja rastjenja kod oba genotipa u svim tretmanima (Sl. 26 i 27), kao i u toku sazrevanja plodova (u tretmanu DSK). Ovakvi rezultati sugerišu da je taj enzim odgovoran za sazrevanje plodova izazivajući ubrzano sazrevanje plodova u tretmanu DSK, od trenutka kada plodovi dostignu svoj tipičan oblik i veličinu.

Neki rezultati takođe ukazuju na to da tretman DSK može da izazove oksidativan stres u listu i korenu različitih biljaka. U listovima paradajza Tahí *i sar.* (2008) su uočili povećanu aktivnost superoksid-dizmutaze (SOD), rastvorljive peroksidaze (POX) i polifenol-oksidge (PPO) u ranijim fazama vodnog deficita, koja se kasnije smanjuje u preostalim fazama ciklusa isušivanja. U istom eksperimentu, aktivnost SOD, POX i PPO je pokazala naizmeničnu povećanu, pa smanjenu aktivnost, paralelno sa naizmeničnim načinom navodnjavanja kod DSK korenova. Povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima je takođe potvrđeno i od strane Lei *i sar.* (2009) i Hu *i sar.* (2010). Ipak, treba naglasiti da su njihovi rezultati iz eksperimenata gde se u DSK tretmanu koristilo mnogo manje vode za navodnjavanje (50% od ON), dok je u ovom

istraživanju korišćeno 70% vode od tretmana ON. Pored toga, u našim prethodnim ogledima praćena je neenzimska aktivnost u plodovima paradajza i krtolama krompira gajenim u plasteničkoj proizvodnji i na otvorenom polju tehnikom DSK. Ovi rezultati pokazuju da povećana aktivnost antioksidativnih jedinjenja kod biljaka tretiranih tehnikom DSK ima pozitivan efekat na nutritivne karakteristike ovih biljaka (Jensen *i sar.*, 2010; Jovanović *i sar.*, 2004).

Rezultati naših proteomik istraživanja su pokazali da je rastenje i ON i DSK plodova Ailsa Craig praćeno sa značajnom promenom antioksidativnih enzima, posebno superoksid-dismutaze (SOD), askorbat-peroksidaze (APX) i tioredoksina. Između posmatranih genotipa, smanjena sinteza antioksidativnih proteina primećena je uglavnom kod *flacca* plodova. Povećana akumulacija u tretmanu DSK i kod *flacca* u ON u odnosu na Ailsa Craig, je uočena kod cTP (hloroplast-triazitni peptid) superoksid dismutaze (tačka 45), dok je citosolna Cu/Zu-superoksid-dismutaza (tačka 70) ostala nepromenjena. Rezultati kod transgenih biljaka duvana pokazali su da povećana pojedinačna ekspresija citosolne Cu/Zu-superoksid-dismutaze ili askorbat-peroksidaze u citosolu, ili njihova kombinacija, ublažava negativne efekte stresa suše (Faize *i sar.*, 2011).

Rezultati proteomik analize takođe pokazuju značajno povećanje citosolne askorbat-peroksidaze (tačka 10) u 30. dpa u tretmanu DSK, koja zajedno sa povećanjem SOD može značajno da poboljša otpornost na stres izazvan tretmanom DSK. Ovi rezultati ukazuju da aktivnost ovih enzima omogućava plodovima u tretmanu DSK da nastavljaju sa rastenjem i posle 30. dpa i da to, potom, doprinosi obrazovanju većih plodova u odnosu na tretman ON.

Rezultati drugih istraživanja takođe ukazuju i na povezanost regulacije sinteze antioksidativnih enzima sa fazom razvića plodova. Faurobert *i sar.* (2007b) i Mondal *i sar.* (2004) su utvrdili da se u plodovima koji počinju da sazrevaju povećava ekspresija enzima za detoksifikaciju H_2O_2 i da to traje do kraja procesa sazrevanja. Iako ovom analizom nisu obuhvaćeni plodovi u kasnijim fazama razvića (početak zrenja i zreli plodovi), povećana sinteza APX (tačke 10, 20, i 49), lokalizovane u različitim delovima ćelije i citosolna SOD (tačka 70) može da se dovede u vezu sa promenama do kojih dolazi u toku razvića plodova u tretmanu DSK i ON. U tretmanu DSK, APX imaju sličan vremenski obrazac ekspresije kao i proteini ćelijskog zida. Sadržaj APX prati

njihovu smanjenu sintezu u 15. dpa, ali njihova biosinteza se tada intenzivira, a u 30. dpa oni dostižu nivo ekspresije APX-aza kao u plodovima u tretmanu ON. Ovo ukazuje na to da tretman DSK može da izazove blagi stres suše koji podstiče različite odbrambene reakcije u plodovima, počevši sa povećanjem biosinteze SOD-aza kao što je utvrđeno u početnim fazama rastenja ćelija.

U analizi proteina iz plodova paradajza, 4 proteina su svrstana u grupu funkcije *odbrane od stresa* i jedan od njih je „heat shock“ protein. Dva proteina (tačke 5 i 32) pripadaju kompleksu koji omogućava oksidaciju vode u fotosintezi i označavaju se kao tzv. „oxygen-evolving enhancer proteins“ (Hoganson i Babcock, 1997). Zahvaljujući tom kompleksu dolazi do oksidativnog razlaganja (fotolize) 2 molekula H_2O_2 i pri tome se izdvajaju 4 H^+ , 4 elektrona koji odlaze na fotosistem II (P680) i izdvaja se O_2 (Yachandra i sar., 1993). To omogućava necikličnu fotofosforilaciju i sintezu redukovanog $NADPH_2$ za potrebe fotosinteze.

U literaturi postoje rezultati koji potvrđuju značajnu ulogu ovih proteina i u povećanju otpornosti na stres (Ali i Komatsu, 2006). U našem ogledu nisu uočene značajne razlike između različitih faza razvića ploda u tretmanu kod ovih proteina. Međutim, poređenjem efekata tretmana utvrđena je povećana sinteza oba proteina kod DSK u odnosu na ON plodove. Pored toga značajna je i njihova povećana sinteza kod *flacca* plodova i to u odnosu na Ailsa Craig u tretmanu ON.

U ovoj grupi proteina, različit način ekspresije ima i „heat shock“ protein 70 (HSP70). Ovaj protein ima ulogu u različitim ćelijskim procesima tako što potpomaže održanje strukture proteina, a utiče i na njihovu translokaciju u različite ćelijske kompartimente (Sung i sar., 2001). Njegova povećana sinteza je utvrđena kod paradajza posle izlaganja stresu hladnoće (Page i sar., 2010). Rezultati Manaa i sar. (2011) su pokazali da je od 4 HSP-a koja su identifikovana u njihovom eksperimentu u kom su izučavali stres soli, HSP70 bio jedini koji je varirao u zavisnosti i od ispitivanog genotipa i efekta soli. Njegova ekspresija je bila povećana kod svih genotipova izloženih stresu soli, ali najviše kod genotipa najosetljivijeg na ovaj stresni faktor. Rezultati naših istraživanja pokazuju da HSP70 ima povećanu ekspresiju u ranijoj fazi intenzivnog rastenja ćelija (15. dpa) u tretmanu DSK u odnosu na ON, dok se u kasnijim fazama razvoja taj efekat ne uočava.

Sledeći protein koji je identifikovan je aneksin p35. Aneksini pripadaju velikoj multifunkcionalnoj porodici proteina koji vezuju fosfolipide i učestvuju u egzocitozi koju stimuliše Ca^{2+} (Bassani *i sar.*, 2004). Faurobert *i sar.* (2007b) su pokazali da povećana ekspresija aneksina p34 kod paradajza raste u periodu od 7. do 21. dpa i da korelira sa ekspanzijom ćelija zida. Rezultati Manaa *i sar.* (2011) su pokazali i porast u regulaciji aneksina p35 posle 14 dana izlaganja korenova paradajza stresu soli. Naši rezultati za aneksin p35 u DSK plodovima nisu pokazali značajan efekat faze razvića ploda, dok u tretmanu ON dolazi do povećanja količine ovog proteina u kasnijoj fazi razvića. Međutim, iako razlike između DSK i ON tretmana, kod oba genotipa, u ekspresiji aneksina p35 nisu utvrđene, trend promene ekspresije HSP70 prati trend promene ekspresije askorbat-peroksidaze i proteina ćelijskog zida kod DSK plodova. Povećana ekspresija proteina koji učestvuju u odbrani od stresa u 30. dpa u tretmanu DSK i slična promena HSP70 u poređenju sa ON plodovima, takođe ukazuje na moguću aktivaciju mehanizma odbrane od stesa koja se javlja za vreme procesa razvića DSK plodova.

7. ZAKLJUČCI

1. Vrednosti sadržaja vode u supstratu, kao što se i očekivalo, su bile značajno niže kod biljaka u tretmanu RDN i u nezalivanoj strani dela supstrata DSK tretmana u odnosu na ON biljke. Dinamika promene strane navodnjavanja kod DSK biljaka je pokazala da se posle prvog okreta vreme potrebno za promenu strane zalivanja skraćuje i kod Ailsa Craig (sa 22 u početku na prosečno 8 u daljem toku) i kod *flacca* biljaka (sa 26 u početku na prosečno 12 u daljem toku). Na osnovu ove dinamike promene i literaturnih podataka može se zaključiti da je skraćivanje vremenskog intervala promene strane zalivanja posledica razvića korenovog sistema, povećanja hidraulične provodljivosti ćelija korena, ali i tzv. „hidrauličnog lifta“, odnosno redistribucije vode između korenova u zalivanoj i sušenoj strani supstrata. Generalno, ovi rezultati ukazuju da se promena strane zalivanja u DSK sistemima mora vršiti uz konstantnu kontrolu sadržaja vode u nezalivanoj strani supstrata da ne bi došlo do sušenja korena.

2. Kod oba genotipa, ispitivani tretmani su uticali na visinu biljaka i to tako da su najveću visinu imale biljke u tretmanu ON. RDN tretman je smanjio porast biljaka i to tako da je visina kod Ailsa Craig biljaka umanjena za 22%, a kod *flacca* za 14% u odnosu na ON biljke. DSK tretman nije uticao na visinu biljaka i redukciju izdanka. Između posmatranih genotipova je uočena razlika u visini biljaka, jer su *flacca* biljke bile niže u odnosu na genotip Ailsa Craig za oko 28%.

3. Rezultati merenja pokazuju da su *flacca* biljke bile ne samo niže, već su imale i znatno manju biomasu od Ailsa Craig. Ispitivanja akumulacije biomase i njene distribucije kod *flacca* ukazuju na trend povećanja procentualnog učešća vegetativne biomase u odnosu na biomasu ploda kod svih tretmana i u odnosu na Ailsa Craig. Ispitivani eksperimentalni uslovi nisu imali značajan uticaj na masu vegetativnih organa, izuzev što je tretman RDN značajno redukovao svežu masu stabla. Odnos suve mase korena i izdanka, kod *flacca* biljaka, ukazuje da je RDN tretman imao veći uticaj na rastenje korena nego na rastenje izdanka, pa se može zaključiti da su smanjeno rastenje i apsorpciona površina korena kod ovih biljaka direktno uticali na manje i

sporije usvajanje vode. Na to indirektno ukazuju i rezultati promene sadržaja vode u supstratu gde su biljke gajene.

4. Na osnovu ispitivanja biomase vegetativnih organa (korena, stabla i listova) i plodova se može zaključiti da kod Ailsa Craig, tretman DSK nije značajno uticao na svežu masu korena, stabla, listova i plodova, dok je RDN tretman redukovao svežu masu ispitivanih organa i to najviše stabla (17% manja u odnosu na ON uslove). Povećanje odnosa suve mase plodova i izdanka (za 10,7%) takođe ukazuje da je DSK tretman uticao na translokaciju asimilata od listova i stabla ka plodovima i zatim na rastenje i razviće plodova ovih biljaka. Rezultati merenja biomase u RDN uslovima su pokazali da tretman nije uticao na suhu masu vegetativnih organa, ali da je redukovao suhu masu plodova (za 14% u odnosu na ON i DSK plodove). Oni su takođe ukazali i na malo izmenjenu raspodelu asimilata, jer je utvrđena nešto veća akumulacija biomase u vegetativnim organima i sporiji transport ka plodovima u odnosu na kontrolne i uslove DSK.

5. Na osnovu ispitivanja fenoloških faza razvića biljaka može se zaključiti da su u odnosu na ON biljke, tretmani DSK i RDN kao tretmani različitog stepena suše (70% i 50% vode u odnosu na ON) usporili razviće biljaka. Ovaj uticaj je bio najizraženiji u fazi kada su plodovi dostigli svoj konačan oblik i veličinu (fenološki kod 71) i kod zrelih plodova (fenološki kod 81). Između posmatranih genotipova su se ispoljile razlike i to tako da se u tretmanu ON, kod *flacca* mutanta prva cvast na glavnom stablu obrazovala 3 dana ranije u odnosu na Ailsa Craig, ali je za ostale faze razvića kasnije trebalo duže vremena. Cvetanje se kod *flacca* biljaka ostvarilo oko 6 dana kasnije u odnosu na Ailsa Craig, pojava plodova tipičnog oblika i veličine od 3-11 dana kasnije i sazrevanje plodova od 7-23 dana kasnije u zavisnosti od primenjenog tretmana. Može se zaključiti da je u osnovi značajno kasnijeg sazrevanja *flacca* biljaka u odnosu na Ailsa Craig smanjena mogućnost sinteze ABA kao jednog od ključnog hormona za procese razvića biljaka, posebno u uslovima suše.

6. Merenja brzine rastenja plodova su pokazala da se najveća brzinu rastenja plodova, kod oba genotipa, ispoljila u uslovima ON, zatim DSK, a najmanja u tretmanu RDN.

Krive rastenja takođe ukazuju i da su se između eksperimentalnih uslova javile razlike i u dužini trajanja i vremenu pojave maksimalne brzine rastenja plodova. Kod genotipa Ailsa Craig, period intenzivnog rastenja plodova je bio sličan u tretmanima ON i RDN, dok je u tretmanu DSK ovaj period trajao 10 dana duže. Kod *flacca* mutanta period intenzivnog rastenja plodova je najkraće trajao u uslovima RDN (12 dana), zatim u ON (15 dana), a najduže u tretmanu DSK (19 dana). Kao rezultat produženog perioda intenzivnog rastenja plodova, srednja vrednost prečnika plodova na kraju eksperimenta bila je slična u tretmanima ON i DSK. Kod tretmana RDN kraći period rastenja i manja brzina doveli su do razvoja manjih plodova. Na osnovu analize krivih rastenja plodova može se zaključiti da je na konačnu veličinu ploda paradajza u ispitivanim eksperimentalnim uslovima više uticala dužina trajanja procesa rastenja od maksimalne brzina rastenja.

7. Eksperimentalni uslovi DSK i RDN su redukovali broj plodova po biljci kod oba genotipa. Međutim, zbog produženog perioda intenzivnog rastenja ćelija, kod Ailsa Craig biljaka su se formirali plodovi sa malo većim prečnikom u odnosu na plodove iz tretmana ON, tako da se ukupan prinos (obračunat na svežu masu) nije statistički značajno razlikovao između ova dva tretmana. U RDN eksperimentalnim uslovima je, zbog manje brzine i dužine trajanja rastenja, došlo do obrazovanja znatno manjih plodova, a to je direktno uticalo na prinos koji je u odnosu na ON i DSK biljke smanjen za oko 30%. Očekivano, plodovi *flacca* biljaka su bili značajno manji od Ailsa Craig (prosečno za 35%). RDN uslovi su doveli do obrazovanja i manjeg broja i manjih plodova, tako da je i prinos ovih biljaka bio značajno manji u odnosu na optimalno zalivane biljke (za 37,0 % u odnosu na ON).

8. Rezultati obračuna efikasnosti u korišćenju vode (WUE) su kod Ailsa Craig, pokazali da je došlo do značajnog povećanja u tretmanima DSK i RDN (za 69,1% i 73,7%) u odnosu na ON biljke. Iako RDN tretman zbog manje količine vode povećava WUE, rezultati su pokazali da je nedostatak ove tehnike što redukuje prinos. Kod *flacca* mutanta značajno povećanje WUE je utvrđeno samo u tretmanu RDN (za 42,9%), dok je u DSK tretmanu primećen pozitivan efekat na efikasnost usvajanja vode *flacca* biljaka, ali zbog varijabilnosti podataka nije utvrđena statistički značajna razlika. Ovi

rezultati potvrđuju da se primenom DSK tehnike mogu smanjiti količine upotrebljene vode za navodnjavanje biljaka, a da se pri tome značajno ne umanju prinos. Ovi rezultati ukazuju da DSK tehnika može biti od posebnog značaja za gajenje paradajza u proizvodnim uslovima gde suša i nedostatak raspoložive vode za navodnjavanje mogu da umanje prinos ove kulture.

9. Biohemijska ispitivanja rastenja plodova paradajza su obavljena na osnovu merenja koncentracije ABA u perikarpu plodova. Ispitivanja koncentracije ABA u perikarpu plodova su potvrdila očekivanu značajnu razliku u koncentraciji ABA između Ailsa Craig i *flacca* plodova. Koncentracija ABA je u plodovima *flacca* biljaka bila za oko 62% manja od koncentracije u plodovima Ailsa Craig, a istovremeno su plodovi *flacca* biljaka bili značajno manji. Kod oba genotipa i u svim tretmanima, koncentracija ABA tokom razvića plodova se menjala i to tako što je došlo do opadanja u fazi intenzivnog rastenja, dok je početak porasta koincidirao sa početkom sazrevanja plodova (45. dpa). Između tretmana ON i DSK, razlike u koncentraciji ABA u plodovima Ailsa Craig su se ispoljile samo u početnoj fazi razvića plodova kada je izmerena veća koncentracija ABA u uslovima ON (za 30%). U tretmanu RDN, kod oba genotipa, u dužem periodu je izmerena veća koncentracija ABA u perikarpu plodova, što je verovatno direktan uticaj suše i može da objasni usporeno rastenje plodova i konačan manji prečnik i masu plodova kod ovih biljaka.

10. Slična dinamika promene aktivnosti jonski vezane peroksidaze ćelijskog zida, u svim tretmanima kao kod Ailsa Craig, je utvrđena i kod *flacca* plodova. Razlike između Ailsa Craig i *flacca* se ispoljavaju u aktivnosti enzima, koja je mnogo manja kod *flacca* u odnosu na izmerene vrednosti kod Ailsa Craig. I kod Ailsa Craig i *flacca* DSK biljaka, aktivnost peroksidaze u plodovima nastavlja da raste i u fazi 60. dpa kada je rastenje plodova završeno. Na osnovu toga se može zaključiti i da peroksidaza u tretmanu DSK, može da ima ulogu i u procesu sazrevanja plodova. Uporedna analiza dinamika promene aktivnosti peroksidaze i koncentracije ABA u plodovima, ukazuje na antagonistički efekat između aktivnosti peroksidaze i količine ABA u svim tretmanima i kod oba genotipa.

11. Biohemijska analiza je obuhvatila i proteomik analizu. Ukupno je izdvojeno 1679 proteinskih tačaka iz perikarpa ploda paradajza, kod 52 tačke je utvrđena statistički značajna razlika između tretmana (ON i DSK), faze razvića plodova (15. dpa i 30. dpa), kao i između ispitivanih genotipova. Na osnovu ovih rezultata i identifikacije proteina zaključeno je da proteini pripadaju sledećim metaboličkim grupama: metabolizmu ugljenih hidrata (13 proteina), metabolizmu aminokiselina (5 proteina), sintezi i degradaciji proteina (8 proteina), proteinima energetskeg metabolizma (3 proteina), proteinima ćelijskog zida (5 proteina); proteinima oksidativnog stresa (8 proteina), proteinima koji učestvuju u odbrani od stresa i „heat shock“ (HSP) proteinima (4 proteina) i za 6 proteina nije utvrđena funkcija. Na osnovu rezultata se može zaključiti i da su različiti nivoi ekspresije ovih proteina posledica ne samo faze razvića plodova ili primenjenog tretmana, već i njihove interakcije.

12. Na osnovu analize proteina koji učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata u plodovima, zaključeno je da većina od 13 identifikovanih proteina ima funkciju u primarnom metabolizmu ugljenih hidrata, prvenstveno u procesima glikolize i ciklusa trikarboksilnih kiselina. Utvrđen je i značajan efekat ispitivanih genotipova, tretmana, ali i faze razvića. Razlike između Ailsa Craig i *flacca* plodova su se ispoljile u fazi optimalnog navodnjavanja biljaka i to tako da se u *flacca* plodovima većina proteina akumulirala u manjoj količini u odnosu na plodove Ailsa Craig. Efekat uticaja tretmana u ispitivanim fazama je pokazao da je u DSK uslovima sporiji metabolički fluks u odnosu na ON uslove, tako da ti rezultati mogu da objasne sporiju dinamiku rastenja plodova u tretmanu DSK i *flacca* u odnosu na ON biljke.

13. Analiza proteina iz grupe metabolizma aminokiselina i sinteze i degradacije proteina, takođe ukazuje na smanjen metabolički fluks u plodovima, jer u DSK tretmanu dolazi do smanjenja sinteze lignina i drugih sekundarnih metabolita u fazi intenzivnog rastenja ćelija (15. dpa), što je primećeno i kod *flacca* u odnosu na Ailsa Craig plodove. Pored toga, u tretmanu DSK i kod *flacca* biljaka u odnosu na Ailsa Craig, dolazi do aktivacije kataboličkih procesa u cilju očuvanja neophodne energije za rastenje plodova i odbranu od stresa.

14. Na osnovu povećane ekspresije proteina ćelijskog zida i proteina energetskog metabolizma, može se pretpostaviti da je metabolički fluks orijentisan ka sintezi proteina ćelijskog zida i stvaranju neophodne energije za ćelijsko rastenje, što omogućava plodovima iz DSK tretmana produžen period rasta, koji na kraju rezultira većim prečnikom plodova u odnosu na ON biljke. Takođe je uočeno da je kod genotipa *flacca* smanjena sinteza svih proteina ćelijskog zida u odnosu na genotip Ailsa Craig, što može da bude uzrok manje veličine plodova kod *flacca*.

15. Povećana sinteza nekih antioksidativnih proteina za vreme rasta i razvika plodova u tretmanu DSK, ukazuje na to da tretman DSK (gde je korišćeno 70% vode od ON) može da izazove blagi stres suše, koji podstiče različite odbrambene reakcije kod biljaka. Ti podaci su u skladu i sa značajnom ulogom peroksidaza ne samo u rastu plodova, već i u antioksidativnoj aktivnosti.

16. Opšte posmatrano, proteomik analiza omogućila je nov uvid u razumevanju metaboličkih i biohemijskih procesa koji su u osnovi rasta ćelija perikarpa plodova. Ovakva dalja istraživanja, posebno u fazi sazrevanja plodova, mogu biti od pomoći za razumevanje efekta tretmana DSK ne samo na rast plodova paradajza, već i na kvalitet ostvarenog prinosa, kao i na nutritivni značaj paradajza.

8. LITERATURA

- Abdel-Rahman M., Thomas T. H., Doss G. J., Howell L. (1975) Changes in endogenous plant hormones in cherry tomato fruits during development and maturation. *Physiologia Plantarum*, 34:39-43. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1975.tb01852.x.
- Adams P., Ho L. C. (1993) Effects of environment on the uptake and distribution of calcium in tomato and on the incidence of blossom-end rot. *Plant and Soil*, 154:127-132. DOI: 10.1007/bf00011081.
- Adams S.R., Cockshull K.E., Cave C.R.J. (2001) Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Annals of Botany*, 88:869-877. DOI: 10.1006/anbo.2001.1524.
- Aganchich B., Tahi H., Wahbi S., Elmodaffar C., Serraj R. (2007) Growth, water relations and antioxidant defence mechanisms of olive (*Olea europaea* L.) subjected to partial root drying (PRD) and regulated deficit irrigation (RDI). *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 141:252-264. DOI: 10.1080/11263500701401893.
- Ahmadi S. H., Andersen M. N., Plauborg F., Poulsen R.T., Jensen C. R., Sepaskhah A. R., Hansen S. (2010) Effects of irrigation strategies and soils on field grown potatoes: Yield and water productivity. *Agricultural Water Management*, 97:1923-1930. DOI: 10.1016/j.agwat.2010.07.007.
- Alcamo J., Moreno J.M., Nováky B., Bindi M., Corobov R., Devoy R.J.N., Giannakopoulos C., Martin E., Olesen J.E., Shvidenko A. (2007) Europe. *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. In: M. L. Parry, et al. (Eds.), *Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge, UK.
- Ali G. M., Komatsu S. (2006) Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *Journal of Proteome Research*, 5:396-403. DOI: 10.1021/pr050291g.
- André J.P., Catesson A.M., Liberman M. (1999) Characters and origin of vessels with heterogenous structure in leaf and flower abscission zones. *Canadian Journal of Botany*, 77:253-261. DOI: 10.1139/b98-213.
- Andrews J. (2003) Regulation of tomato fruit growth by peroxidases, Doctoral Dissertation University of Lancaster, UK.

- Andrews J., Adams S. R., Burton K. S., Edmondson R. N. (2002) Partial purification of tomato fruit peroxidase and its effect on the mechanical properties of tomato fruit skin. *Journal of Experimental Botany*, 53:2393-9. DOI: 10.1093/jxb/erf109.
- Andrews J., Malone M., Thompson D. S., Ho L. C., Burton K. S. (2000) Peroxidase isozyme patterns in the skin of maturing tomato fruit. *Plant, Cell & Environment*, 23:415-422. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2000.00555.x.
- Asakura T., Hirose S., Asatsuma S., Nanjo Y., Nakaizumi T., Itoh K., Hori H., Komatsu S., Mitsui T. (2007) Proteomic characterization of tissue expansion of rice scutellum stimulated by abscisic acid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71:1260-8. DOI: 10.1271/bbb.60675.
- Asch F. (2000) Laboratory Manual on Determination of Absciscic Acid by indirect Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). Technical Series 1-2000, Ed. The Royal Veterinary and Agricultural University, 1-21.
- Bacon M. A., Wilkinson S., Davies W. J. (1998) pH-regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent. *Plant Physiology*, 118:1507-1515. DOI: 10.1104/pp.118.4.1507.
- Bacon M. A., Thompson D. S., Davies W. J. (1997) Can cell wall peroxidase activity explain the leaf growth response of *Lolium temulentum* L. during drought? *Journal of Experimental Botany*, 48:2075-2085. DOI: 10.1093/jxb/48.12.2075.
- Bano A, Dörffling K, Bettin D, Hahn H. (1993) Absciscic acid and cytokinins as possible root-to-shoot signals in xylem sap of rice plants in drying soil. *Functional Plant Biology*, 20:109-115. DOI: 10.1071/PP9930109.
- Bano A., Hansen H., Dörffling K., Hahn H. (1994) Changes in the contents of free and conjugated abscisic acid, phaseic acid and cytokinins in xylem sap of drought stressed sunflower plants. *Phytochemistry*, 37:345-347. DOI: 10.1016/0031-9422(94)85058-5.
- Barroso C., Romero L.C., Cejudo F.J., Vega J.M., Gotor C. (1999) Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 40:729-736. DOI: 10.1023/A:1006285016296.

- Bassani M., Neumann P. M., Gepstein S. (2004) Differential expression profiles of growth-related genes in the elongation zone of maize primary roots. *Plant Molecular Biology*, 56:367-80. DOI: 10.1007/s11103-004-3474-y.
- Bénard C., Bernillon S., Biais B., Osorio S., Maucourt M., Ballias P., Deborde C., Colombié S., Cabasson C., Jacob D., Vercambre G., Gautier H., Rolin D., Génard M., Fernie A. R., Gibon Y., Moing A. (2015) Metabolomic profiling in tomato reveals diel compositional changes in fruit affected by source–sink relationships. *Journal of Experimental Botany*. DOI: 10.1093/jxb/erv151.
- Bertin N. (2005) Analysis of the tomato fruit growth response to temperature and plant fruit load in relation to cell division, cell expansion and DNA endoreduplication. *Annals of Botany*, 95:439–447. DOI: 10.1093/aob/mci042.
- Beyer E. M., Morgan P. W. (1971) Abscission: the role of ethylene modification of auxin transport. *Plant Physiology*, 48:208-12. DOI: 10.1104/pp.48.2.208.
- Bhatti K.H., Rashid T., Chaudhary M.F. (2000) Effect of drought stress on the yield, glutamine synthetase activity and protein contents in four varieties of tomato. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3:1772-1774. DOI: 10.3923/pjbs.2000.1772.1774.
- Bondada B. R., Matthews M. A., Shackel K. A. (2005) Functional xylem in the post-veraison grape berry. *Journal of Experimental Botany*, 56:2949-57. DOI: 10.1093/jxb/eri291
- Bošnjak Đ., Pejić B. (1995) Turnus kao osnova zalivnog režima paradajza. u: *Seminara agronoma (XXIX)*, sveska 23, str. 369-377
- Bradford K. (1983) Water relations and growth of the flacca tomato mutant in relation to abscisic acid. *Plant Physiology*, 72:251-255. DOI: 10.1104/pp.72.1.251.
- Bray E.A. (2001) *Plant response to water-deficit stress*, Ed.: eLS, John Wiley & Sons, Ltd. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001298.pub2.
- Burbidge A., Grieve T. M., Jackson A., Thompson A., McCarty D. R., Taylor I. B. (1999) Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *The Plant Journal*, 17:427-31. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00386.x
- Buta J. G., Spaulding D. W. (1994) Changes in indole-3-acetic acid and abscisic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development and

- ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* 13:163-166. DOI: 10.1007/bf00196382.
- Caldwell M. M., Dawson T. E. (1998) Hydraulic lift: consequences of water efflux from the roots of plants. *Oecologia*, 113:151-161. DOI: 10.1007/s004420050363.
- Carrari F., Fernie A. (2006) Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 57:1883-1897. DOI: 10.1093/jxb/erj020.
- Chance B., Maehly A.C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 1:764-775. DOI: 10.1002/9780470110171.ch14.
- Chaves M. M. (1991) Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 42:1-16. DOI: 10.1093/jxb/42.1.1.
- Chaves M. M., Maroco J.P., Pereira J.S. (2003) Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30:239-264. DOI: 10.1071/FP02076.
- Chaves M. M., Santos T. P., Souza C. R., Ortuño M. F., Rodrigues M. L., Lopes C. M., Maroco J. P., Pereira J. S. (2007) Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Annals of Applied Biology*, 150:237-252. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2006.00123.x.
- Chen G., Shi Q., Lips S. H., Sagi M. (2003) Comparison of growth of *flacca* and wild-type tomato grown under conditions diminishing their differences in stomatal control. *Plant Science*, 164:753-757. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00060-8.
- Cowan A. K., Cripps R. F., Richings E. W., Taylor N. J. (2001) Fruit size: Towards an understanding of the metabolic control of fruit growth using avocado as a model system. *Physiologia Plantarum*, 111:127-136. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110201.x.
- Đaković T., Jovanović Z. (2003) The role of cell wall peroxidase in the inhibition of leaf and fruit growth. *Bulgarian Journal of Plant Physiology, Special Issue*:264-272.
- Damjanović M., Zdravković J., Stevanović D., Marković Ž., Zdravković M. (2001) *Proizvodnja povrća u plastenicima*. Izd. Present. ISBN: 8683415015, 9788683415014.
- Davies W. J., Wilkinson S., Loveys B. R. (2002) Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use

- efficiency in agriculture. *New Phytologist*, 153:449-460. DOI: 10.1046/j.0028-646X.2001.00345.x.
- Davies W. J., Bacon M. A., Thompson S. D., Sobeih W. Y., González Rodríguez L. (2000) Regulation of leaf and fruit growth in plants growing in drying soil: exploitation of the plants' chemical signalling system and hydraulic architecture to increase the efficiency of water use in agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 51:1617-1626. DOI: 10.1093/jexbot/51.350.1617.
- De Jong M., Mariani C., Vriezen W. H. (2009) The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany*, 60:1523-1532. DOI: 10.1093/jxb/erp094.
- De la Hera M. L., Romero P., Gómez-Plaza E., Martínez A. (2007) Is partial root-zone drying an effective irrigation technique to improve water use efficiency and fruit quality in field-grown wine grapes under semiarid conditions? *Agricultural Water Management*, 87:261-274. DOI: 10.1016/j.agwat.2006.08.001.
- De Souza I. R. P., MacAdam J. W. (1998) A transient increase in apoplastic peroxidase activity precedes decrease in elongation rate of B73 maize (*Zea mays*) leaf blades. *Physiologia Plantarum*, 104:556-562. DOI: 10.1034/j.1399-3054.1998.1040406.x.
- Dodd I. C. (2003) Leaf area development of ABA-deficient and wild-type peas at two levels of nitrogen supply. *Functional Plant Biology*, 30:777-783. DOI: 10.1071/FP02227.
- Dodd I. C., Stikić R., Davies W. J. (1996) Chemical regulation of gas exchange and growth of plants in drying soil in the field. *Journal of Experimental Botany*, 47:1475-1490. DOI: 10.1093/jxb/47.10.1475.
- Dodd I. C., Egea G., Davies W. J. (2008) Accounting for sap flow from different parts of the root system improves the prediction of xylem ABA concentration in plants grown with heterogeneous soil moisture. *Journal of Experimental Botany*, 59:4083-4093. DOI: 10.1093/jxb/ern246.
- Dodd I. C., Theobald J.C., Richer S. K., Davies W. J. (2009) Partial phenotypic reversion of ABA-deficient *flacca* tomato (*Solanum lycopersicum*) scions by a wild-type rootstock: normalizing shoot ethylene relations promotes leaf area but

- does not diminish whole plant transpiration rate. *Journal of Experimental Botany*, 60:4029-4039. DOI: 10.1093/jxb/erp236.
- Dodd I.C. (2007) Soil moisture heterogeneity during deficit irrigation alters root-to-shoot signalling of abscisic acid. *Functional Plant Biology*, 34:439-448. DOI: 10.1071/FP07009.
- Dos Santos T., Lopes C., Rodrigues M., De Souza C., Maroco J., Pereira J., Silva J., Chaves M. (2003) Partial rootzone drying: effects on growth and fruit quality of field-grown grapevines (*Vitis vinifera*). *Functional Plant Biology*, 30:663-671. DOI: 10.1071/FP02180.
- Dos Santos T. P., Lopes C. M., Rodrigues L. M., De Souza C. R., Da Silva R., M. Jorge, Maroco J. P., Pereira J. S., Chaves M. M. (2007) Effects of deficit irrigation strategies on cluster microclimate for improving fruit composition of Moscatel field-grown grapevines. *Scientia Horticulturae*, 112:321-330. DOI: 10.1016/j.scienta.2007.01.006.
- Dry P. R., Loveys B. R., Stoll M., Stewart D., McCarthy M. G. (2000) Partial rootzone drying - an update. *The Australian Grapegrower and Winemaker (Annual Technical Issue 2000)*: 35-39.
- Du Jardin P., Rojas-Beltran J., Gebhardt C., Brasseur R. (1995) Molecular cloning and characterization of a soluble inorganic pyrophosphatase in potato. *Plant Physiology*, 109:853-60. DOI: 10.1104/pp.109.3.853.
- Dyer J. H., Maina A., Gomez I. D., Cadet M., Oeljeklaus S., Schiedel A. C. (2009) Cloning, expression and purification of an acetoacetyl CoA thiolase from sunflower cotyledon. *International Journal of Biological Sciences* 5:736-744. DOI: 10.7150/ijbs.5.736.
- EEA. (2012) Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2012, Copenhagen. <http://www.eea.europa.eu/publications/climate-impacts-and-vulnerability-2012>
- Ehret D., Ho L. (1986) Effects of osmotic potential in nutrient solution on diurnal growth of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 37:1294-1302. DOI: 10.1093/jxb/37.9.1294.
- English M.J., Musick J.T., Murty V.V.N. (1990) Deficit irrigation, in: G. J. Hoffman, et al. (Eds.), *Management of farm irrigation systems*, Ed. American Society of Agricultural Engineers, ASAE monograph no. 9. pp. 1020. ISBN 0-929355-11-3

- European Commission Directorate – General for Agriculture and Rural Development. (2008) EU agriculture – taking on the climate change challenge, European Communities, EU.
http://ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/climate_change/leaflet_en.pdf
- Faize M., Burgos L., Faize L., Piqueras A., Nicolas E., Barba-Espin G., Clemente-Moreno M. J., Alcobendas R., Artlip T., Hernandez J. A. (2011) Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 62:2599-613. DOI: 10.1093/jxb/erq432.
- Fanwoua J., Bairam E., Delaire M., Buck-Sorlin G. (2014) The role of branch architecture in assimilate production and partitioning: the example of apple (*Malus domestica*). *Frontiers in Plant Science*, 5:338. DOI: 10.3389/fpls.2014.00338.
- Fanwoua J., De Visser P. H. B., Heuvelink E., Yin X., Struik P.C., Marcelis L. F. M. (2013) A dynamic model of tomato fruit growth integrating cell division, cell growth and endoreduplication. *Functional Plant Biology* 40:1098-1114. DOI: 10.1071/FP13007.
- FAO. (2015) How to feed the world in 2050.
http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- FAOSTAT. (2015) <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>.
- Faurobert M., Pelpoir E., Chaïb J. (2007a) Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues, In: H. Thiellement, et al. (Eds.), *Plant Proteomics Methods and Protocols*, Ed. Humana Press Inc, pp. 9-14. ISBN: 1588296350
- Faurobert M., Mihr C., Bertin N., Pawlowski T., Negroni L., Sommerer N., Causse M. (2007b) Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiology*, 143:1327-1346. DOI: 10.1104/pp.106.092817.
- Fereres E., Soriano M.A. (2007) Deficit irrigation for reducing agricultural water use. *Journal of Experimental Botany*, 58:147-159. DOI: 10.1093/jxb/erl165.

- Foolad M. (2007) Current status of breeding tomatoes for salt and drought tolerance, In: M. Jenks, et al. (Eds.), *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, Ed. Springer Netherlands. pp. 669-700. ISBN: 978-1-4020-5578-2
- Foyer C. H., Noctor G. (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28:1056-1071. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x.
- Freitas S. T., Shackel K. , Mitcham E. (2011) Absciscic acid triggers whole-plant and fruit-specific mechanisms to increase fruit calcium uptake and prevent blossom end rot development in tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 1-12. DOI: 10.1093/jxb/erq430.
- Fry S. C. (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37:165-186. DOI: doi:10.1146/annurev.pp.37.060186.001121.
- Gillaspy G., Ben-David H., Gruissem W. (1993) Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell*, 5:1439-1451. DOI: 10.1105/tpc.5.10.1439.
- Giovannoni J.J. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 16: 170-180. DOI: 10.1105/tpc.019158.
- Gowing D J G, Davies W J, Jones H G. (1990) A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus x domestica* Borkh. *Journal of Experimental Botany*, 41:1535-1540. DOI: 10.1093/jxb/41.12.1535.
- Guichard S., Bertin N., Leonardi C., Gary C. (2001) Tomato fruit quality in relation to water and carbon fluxes. *Agronomie*, 21:385-392. DOI: 10.1051/agro:2001131.
- Hatfield R.D., Ralph J., Grabber J. H. (1999) Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79:403-407. DOI:10.1002/(sici)1097-0010(19990301)79:3<403::aid-jsfa263>3.0.co;2-0.
- Hayashi S., Tanabe K. (1991) *Basic knowledge of fruit tree culture*, Ed. Association Agriculture Press, Japan.
- Herde O., Pena C., Wasternack C., Willmitzer L., Fisahn J. (1999) Electric signaling and pin2 gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiology*, 119:213-218. DOI: 10.1104/pp.119.1.213

- Ho L. (1992) Fruit growth and sink strength, In: Marshall, C. and Grace, J. (Eds.), Fruit and Seed Production. Aspects of Development, Environmental Physiology and Ecology, Ed. Cambridge University Press, pp. 101-124. ISBN: 0521373506
- Ho L. (1996) Tomato, In: Zamski, E., and Schaffer, A. (Eds.), Photoassimilate distribution in plants and crops source-sink relationships, Ed. Marcel Dekker In. pp. 709–728, ISBN: 9780824794408.
- Ho L., Sjut V., Hoad V. (1983) The effect of assimilate supply on fruit growth and hormone levels in tomato plants. *Plant Growth Regulation*, 1:155-171. DOI: 10.1007/BF00036995
- Ho L. C., Grange R. I., Picken A. J. (1987) An analysis of the accumulation of water and dry matter in tomato fruit. *Plant, Cell & Environment*, 10:157-162. DOI: 10.1111/1365-3040.ep11602110.
- Ho Lim C., White Philip J. (2005) A cellular hypothesis for the induction of blossom-end rot in tomato fruit. *Annals of Botany*, 95:571-581. DOI: 10.1093/aob/mci065.
- Hoganson C. W., Babcock G. T. (1997) A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. *Science*, 277:1953-6. DOI: 10.1126/science.277.5334.1953.
- Holbrook N. M., Shashidhar V.R., James R.A., Munns R. (2002) Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *Journal of Experimental Botany*, 53:1503-1514. DOI: 10.1093/jexbot/53.373.1503.
- Hooker T.S., Thorpe T.A. (1997) Effects of water deficit stress on the developmental growth of excised tomato roots cultured in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 33:245-251. DOI: 10.1007/s11627-997-0031-9.
- Hu T., Kang S., Li F., Zhang J. (2011) Effects of partial root-zone irrigation on hydraulic conductivity in the soil-root system of maize plants. *Journal of Experimental Botany*, 62:4163-72. DOI: 10.1093/jxb/err110.
- Hu T., Yuan L., Wang J., Kang S., Li F. (2010) Antioxidation responses of maize roots and leaves to partial root-zone irrigation. *Agricultural Water Management* 98:164-171. DOI: 10.1016/j.agwat.2010.06.019.

- Imber D., Tal M. (1970) Phenotypic reversion of *flacca*, a wilted mutant of tomato, by abscisic acid. *Science*, 169:592-3. DOI: 10.1126/science.169.3945.592
- IPCC. (2014) Climate Change 2014: mitigation of climate change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, In: O. Edenhofer, et al. (Eds.), Ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Ismail M. R., Phizackerley S. (2009) Effects of partial rootzone and controlled deficit irrigation on growth, yield and peroxidase activities of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *International Journal of Agricultural Research*, 1: 46-52. DOI: 10.3923/ijar.2009.46.52.
- Jackson J. (2003) Biology of apples and pears. Ed. University Press, Cambridge. ISBN:0521021057
- Jajarmi V. (2009) Effect of water stress on germination indices in seven wheat cultivar. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 49:105-106.
- Jensen C. R., Battilani A., Plaumborg F., Psarras G., Chantzoulakis K., Janowiak F., Stikić R., Jovanović Z., Li G., Qi X., Liu F., Jacobsen S.-E., Andersen M. N. (2010) Deficit irrigation based on drought tolerance and root signalling in potatoes and tomatoes. *Agricultural Water Management*, 98:403-413. DOI: 10.1016/j.agwat.2010.10.018.
- Jia H-F., Chai Y-M., Li C-L., Lu D., Luo J-J., Qin L., Shen Y-Y. (2011) Absciscic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology* 157:188-199. DOI: 10.1104/pp.111.177311.
- Jiang Y., Deyholos M. K. (2006) Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Biolgy*, 6:25. DOI: 10.1186/1471-2229-6-25.
- Jiang Y., Joyce D. C., Macnish A. J. (2000) Effect of abscisic acid on banana fruit ripening in relation to the role of ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19:106-111. DOI: 10.1007/s003440000011.
- Johnson R. W., Dixon M. A., Lee D. R. (1992) Water relations of the tomato during fruit growth. *Plant, Cell & Environment*, 15:947-953. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1992.tb01027.x.

- Jones H. G., Sharp C. S., Higgs K. H. (1987) Growth and water relations of wilted mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Journal of Experimental Botany, 38:1848-1856. DOI: 10.1093/jxb/38.11.1848.
- Jovanović Z., Stikić R. (2012) Strategies for improving water productivity and quality of agricultural crops in an era of climate change, In: T. S. Lee (Ed.), Irrigation Systems and Practices in Challenging Environments, Ed. InTech. pp. 77-102. ISBN: 978-953-51-0420-9.
- Jovanović Z., Đaković T., Stikić R., Prokić Lj., Hadži-Tašković Šukalović V. (2004) Effect of N deficiency on leaf growth and cell wall peroxidase activity in contrasting maize genotypes. Plant and Soil, 265:211-223. DOI: 10.1007/s11104-005-0503-9.
- Kang S., Zhang J. (2004) Controlled alternate partial root-zone irrigation: its physiological consequences and impact on water use efficiency. Journal of Experimental Botany, 55:2437-2446. DOI: 10.1093/jxb/erh249.
- Kang S., Liang Z., Hu W., Zhang J. (1998) Water use efficiency of controlled alternate irrigation on root-divided maize plants. Agricultural Water Management, 38:69-76.
- Kang S., Hu X., Goodwin I., Jerie P. (2002) Soil water distribution, water use, and yield response to partial root zone drying under a shallow groundwater table condition in a pear orchard. Scientia Horticulturae, 92:277-291. DOI: 10.1016/S0304-4238(01)00300-4.
- Kerepesi I., Galiba G. (2000) Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. Crop Science, 40:482-487. DOI: 10.2135/cropsci2000.402482x.
- Kirda C., Topcu S., Kaman H., Ulger A. C., Yazici A., Cetin M., Derici M. R. (2005) Grain yield response and N-fertiliser recovery of maize under deficit irrigation. Field Crops Research, 93:132-141. DOI: 10.1016/j.fcr.2004.09.015.
- Kirda C., Cetin M., Dasgan Y., Topcu S., Kaman H., Ekici B., Derici M. R., Ozguven A. I. (2004) Yield response of greenhouse grown tomato to partial root drying and conventional deficit irrigation. Agricultural Water Management, 69:191-201. DOI: 10.1016/j.agwat.2004.04.008.

- Kjellström E., Barring L., Jacob D., Jones R., Lenderink G., Schär C. (2007) Modelling daily temperature extremes: recent climate and future changes over Europe. *Climatic Change*, 81:249-265. DOI: 10.1007/s10584-006-9220-5.
- Knapp S. (2014) New nomenclature for *Lycopersicon*,
http://solgenomics.net/about/solanum_nomenclature.pl.
- Kojima K. (1996) Changes of abscisic acid, indole-3-acetic acid and gibberellin-like substances in the flowers and developing fruitlets of citrus cultivar 'Hyuganatsu'. *Scientia Horticulturae*, 65:263-272. DOI: 10.1016/0304-4238(96)00882-5.
- Kojima K., Kuraishi S., Sakurai N., Fusao K. (1993) Distribution of abscisic acid in different parts of the reproductive organs of tomato. *Scientia Horticulturae*, 56:23-30. DOI: 10.1016/0304-4238(93)90098-B.
- Kudozarova G. R., Vysotskaya L. B., Cherkozyanova A., Dodd I. C. (2007) Effect of partial rootzone drying on the concentration of zeatin-type cytokinins in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) xylem sap and leaves. *Journal of Experimental Botany*, 58:161-8. DOI: 10.1093/jxb/erl116.
- Kulkarni M., Deshpande U. (2006) Comparative studies in stem anatomy and morphology in relation to drought resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *American Journal of Plant Physiology*, 1:82-88. DOI: 10.3923/ajpp.2006.82.88.
- Kumar R., Khurana A., Sharma A. K. (2014) Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*. DOI: 10.1093/jxb/eru277.
- Lee H., Guo Y., Ohta M., Xiong L., Stevenson B., Zhu J. K. (2002) LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *The Embo Journal*, 21:2692-702. DOI: 10.1093/emboj/21.11.2692.
- Lei S., Yunzhou Q., Fengchao J., Changhai S., Chao Y., Yuxin L., Mengyu L., Baodi D. (2009) Physiological mechanism contributing to efficient use of water in field tomato under different irrigation. *Plant Soil Environment*, 55:128-133.
- Leib B.G., Caspari H.W., Redulla C.A., Andrews P.K., Jabro J.J. (2006) Partial rootzone drying and deficit irrigation of 'Fuji' apples in a semi-arid climate. *Irrigation Science*, 24:85-99. DOI: 10.1007/s00271-005-0013-9.

- Leng P., Yuan B., Guo Y. (2014) The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 65:4577-88. DOI: 10.1093/jxb/eru204
- Li J., Wu X. D., Hao S. T., Wang X. J., Ling H. Q. (2008) Proteomic response to iron deficiency in tomato root. *Proteomics*, 8:2299-311. DOI: 10.1002/pmic.200700942.
- Liang J., Zhang J., Wong M. H. (1996) Effects of air-filled soil porosity and aeration on the initiation and growth of secondary roots of maize (*Zea mays*). *Plant and Soil*, 186:245-254. DOI: 10.1007/bf02415520.
- Lin C. C., Kao C. H. (2001) Abscisic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Science*, 160:323-329. DOI: 10.1016/S0168-9452(00)00396-4.
- Linforth R. S. T., Taylor I. B., Duckham S. C., Al-Naieb R. J., Bowman W. R., Marples B. A. (1990) The metabolism and biological activity of ABA analogues in normal and *flacca* mutant tomato plants. *New Phytologist*, 115:517-521. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00479.x.
- Liu F., Shahnazari A., Andersen M. N., Jacobsen S.-E., Jensen C. R. (2006a) Effects of deficit irrigation (DI) and partial root drying (PRD) on gas exchange, biomass partitioning, and water use efficiency in potato. *Scientia Horticulturae*, 109:113-117. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.04.004.
- Liu F., Shahnazari A., Andersen M. N., Jacobsen S. E., Jensen C. R. (2006b) Physiological responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) to partial root-zone drying: ABA signalling, leaf gas exchange, and water use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 57:3727-35. DOI:10.1093/jxb/erl131
- Liu F., Savić S., Jensen C. R., Shahnazari A., Jacobsen S. E., Stikić R., Andersen M. N. (2007) Water relations and yield of lysimeter-grown strawberries under limited irrigation. *Scientia Horticulturae*, 111:128-132. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.10.006.
- Liu F., Song R., Zhang X., Shahnazari A., Andersen M. N., Plauborg F., Jacobsen S.-E., Jensen C. R. (2008) Measurement and modelling of ABA signalling in potato (*Solanum tuberosum* L.) during partial root-zone drying. *Environmental and Experimental Botany*, 63:385-391. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2007.11.015.

- Lytovchenko A., Eickmeier I., Pons C., Osorio S., Szecowka M., Lehmberg K., Arrivault S., Tohge T., Pineda B., Anton MT., Hedtke B., Lu Y., Fisahn J., Bock R., Stitt M., Grimm B., Granell A., Fernie A. (2011) Tomato fruit photosynthesis is seemingly unimportant in primary metabolism and ripening but plays a considerable role in seed development. *Plant Physiology*, 157:1650–1663. DOI: 10.1104/pp.111.186874.
- MacAdam J.W., Nelson C.J., Sharp R.E. (1992) Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiology*, 99:872-878. DOI: 10.1104/pp.99.3.879
- Mackay T. F. C., Stone E. A., Ayroles J. F. (2009) The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nature Reviews Genetics*, 10:565-577. DOI: 10.1038/nrg2612.
- Manaa A., Ben Ahmed H., Valot B., Bouchet J. P., Aschi-Smiti S., Causse M., Faurobert M. (2011) Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 62:2797-2813. DOI: 10.1093/jxb/erq460.
- Mansfield T A, Hetherington A M, Atkinson C J. (1990) Some current aspects of stomatal physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41:55-75. DOI: doi:10.1146/annurev.pp.41.060190.000415.
- Marjanović M., Stikić R., Vucelić-Radović B., Savić S., Jovanović Z., Bertin N., Faurobert M. (2012) Growth and proteomic analysis of tomato fruit under partial root-zone drying. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 16:343-56. DOI: 10.1089/omi.2011.0076.
- Marković Ž. (1997) Gajenje povrća. Izd. Institut za istraživanja u poljoprivredi, Srbija, Beograd.
- Martre P. (2002) Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology*, 130:2101-2110. DOI: 10.1104/pp.009019.
- Massot C., Genard M., Stevens R., Gautier H. (2010) Fluctuations in sugar content are not determinant in explaining variations in vitamin C in tomato fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:751-7. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.06.001.

- Matthews M., Shackel K. (2005) Growth and water transport in fleshy fruit, In: M. Holbrook and Z. M. (Eds.), Vascular Transport in Plants, Ed. Elsevier. ISBN: 978-0-12-088457-5
- Maurel C., Chrispeels M. J. (2001) Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology*, 125:135-138. DOI: 10.1104/pp.125.1.135.
- McQueen-Mason S. J., Cosgrove D. J. (1995) Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiology*, 107:87-100. DOI: 10.1104/pp.107.1.87.
- Meier U. (2001) Growth stages of mono- and dicotyledonous plants, BBCH Monograph, Ed. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry. pp. 158. ISBN: 3826331524
- Mihr C., Braun H.P. (2003) Proteomics in plant biology, In: P. Conn (Ed.), Handbook of Proteomics, Ed. Humana Press. pp. 409-416. ISBN: 978-1-59259-414-6.
- Milosavljević A. (2012) Uticaj delimičnog isušivanja korenova na ekspresiju NCED, TAO1 i EIL1 gena i rastenje divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Doktorska disertacija, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.
- Milosavljević A., Prokić Lj., Marjanović M., Stikić R., Sabovljević A. (2012) The effects of drought on the expression of *TAO1*, *NCED* and *EIL1* genes and ABA content in tomato wild-type and *flacca* mutant. *Archives of Biological Sciences*, 64:297-306. DOI: 10.2298/abs1201297m.
- Mingo D. M., Bacon M.A., Davies W. J. (2003) Non-hydraulic regulation of fruit growth in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* cv. Solairo) growing in drying soil. *Journal of Experimental Botany*, 54:1205-1212. DOI: 10.1093/jxb/erg120.
- Mingo D.M., Theobald J.C., Bacon M.A., Davies W.J., Dodd I.C. (2004) Biomass allocation in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown under partial rootzone drying: enhancement of root growth. *Functional Plant Biology*, 31:971-978. DOI: 10.1071/FP04020.
- Mitchell J. P., Shennan C., Grattan S. R. (1991) Developmental changes in tomato fruit composition in response to water deficit and salinity. *Physiologia Plantarum*, 83:177-185. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1991.tb01299.x.

- Molina C., Rotter B., Horres R., Udupa S., Besser B., Bellarmino L., Baum M., Matsumura H., Terauchi R., Kahl G., Winter P. (2008) SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. *BMC Genomics*, 9:553. DOI: 10.1186/1471-2164-9-553.
- Mondal K., Sharma N. S., Malhotra S. P., Dhawan K., Singh R. (2004) Antioxidant systems in ripening tomato fruits. *Biologia Plantarum*, 48:49-53. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000024274.43874.5b.
- Monselise S. P., Varga A., Bruinsma J. (1978) Growth analysis of the tomato fruit, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Annals of Botany*, 42:1245-1247.
- Morison J. I., Baker N. R., Mullineaux P. M., Davies W. J. (2008) Improving water use in crop production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363:639-58. DOI:10.1098/rstb.2007.2175.
- Nagel O. W., Konings H., Lambers H. (1994) Growth rate, plant development and water relations of the ABA-deficient tomato mutant *sitiens*. *Physiologia Plantarum*, 92:102-108. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1994.tb06661.x.
- Ndimba B. K., Chivasa S., Simon W. J., Slabas A. R. (2005) Identification of Arabidopsis salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 5:4185-96. DOI: 10.1002/pmic.200401282.
- Neill S. J., McGaw B. A., Horgan R. (1986) Ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid production in *flacca*, a wilted mutant of tomato, subjected to water deficiency and pre-treatment with abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 37:535-541. DOI: 10.1093/jxb/37.4.535.
- Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9:255-62. DOI: 10.1002/elps.1150090603.
- Nitsch L., Kohlen W., Oplaat C., Charnikhova T., Cristescu S., Michieli P., Wolters-Arts M., Bouwmeester H., Mariani C., Vriezen W. H., Rieu I. (2012) ABA-deficiency results in reduced plant and fruit size in tomato. *Journal of Plant Physiology*, 169:878-83. DOI: 10.1016/j.jplph.2012.02.004.

- Noctor G., Foyer C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49:249-279. DOI: 10.1146/annurev.arplant.49.1.249
- Ouyang B., Yang T., Li H., Zhang L., Zhang Y., Zhang J., Fei Z., Ye Z. (2007) Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis. *Journal of Experimental Botany*, 58:507-520. DOI: 10.1093/jxb/erl258.
- Page D., B. Gouble., Valot B., Bouchet J. P., Callot C., Kretschmar A., Causse M., Renard C.M.C.G., Faurobert M. (2010) Protective proteins are differentially expressed in tomato genotypes differing for their tolerance to low-temperature storage. *Planta*, 232:483–500. DOI: 10.1007/s00425-010-1184-z.
- Palma J. M., Corpas F. J., del Rio L. A. (2011) Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. *Journal of Proteomics*, 74:1230-43. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.04.010.
- Palmer S. J., Davies W. J. (1996) An analysis of relative elemental growth rate, epidermal cell size and xyloglucan endotransglycosylase activity through the growing zone of ageing maize leaves. *Journal of Experimental Botany* 47:339-347. DOI: 10.1093/jxb/47.3.339.
- Passardi F., Penel C., Dunand C. (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9:534-40. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.09.002
- Pećinar I. (2015) Morfo-anatomska i citološka analiza ploda paradajza u uslovima suše, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Pekić-Quarre S., Stikić R., Vucelić Radović B. (2005) Citološke, biohemijske i fiziološke osnove rastenja biljaka, Izd. Poljoprivredni fakultet, Beograd. ISBN 86-7834-005-3.
- Perez-Garcia A., Pereira S., Pissarra J., Garcia Gutierrez A., Cazorla F.M., Salema R., De Vicente A. (1998) Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. *Planta*, 206:426-434. DOI: 10.1007/s004250050418.

- Popović T., Jovanović O., Živlak B. (2004) Trendovi temperature i padavina u SCG kao moguća posledica globalnog otopljanja, Konferencija: Sistemi upravljanja zaštitom životne sredine, Izd. NVO "Zora XXI", Novi Sad.
- Preedy V., Watson R. (2008) Tomatoes and Tomato Products Nutritional, Medicinal and Therapeutic Properties, Ed. CRC Press. pp. 665. ISBN 9781578085347
- Prieto I., Armas C., Pugnaire F. I. (2012) Water release through plant roots: new insights into its consequences at the plant and ecosystem level. *New Phytologist*, 193:830-841. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.04039.x.
- Prokić Lj. (2009) Mehanizmi i reakcije stoma u uslovima dejstva stresnih faktora., Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Prokić Lj., Stikić R. (2011) Effects of different drought treatments on root and shoot development of the tomato wild type and *flacca* mutant. *Archives of Biological Sciences*, 63:1167-1171. DOI:10.2298/ABS1104167P
- Pulupol L. U., Behboudian M. H., Fisher K. J. (1996) Growth, yield, and postharvest attributes of glasshouse tomatoes produced under deficit irrigation. *HortScience*, 31:926-929.
- Quarrie S. A., Whitford P. N., Appleford N. E. J., Wang T. L., Cook S. K., Henson I. E., Loveys B. R. (1988) A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta*, 173:330-339. DOI: 10.1007/bf00401020.
- Ramagli L.S., Rodriguez L. V. (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis*, 6:559-563. DOI: 10.1002/elps.1150061109.
- Rančić D. (2011) Morfo-anatomska analiza paradajza u uslovima suše, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Riccardi F., Gazeau P., Vienne D., Zivy M. (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize, quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology*, 117:1253–1263. DOI: 10.1104/pp.117.4.1253.

- Rocco M., D'Ambrosio C., Arena S., Faurobert M., Scaloni A., Marra M. (2006) Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. *Proteomics*, 6:3781-91. DOI: 10.1002/pmic.200600128
- Rodrigues M.L., Santos T.P., Rodrigues A.P., de Souza C.R., Lopes C.M., Maroco J.P., Pereira J.S., Chaves M.M. (2008) Hydraulic and chemical signalling in the regulation of stomatal conductance and plant water use in field grapevines growing under deficit irrigation. *Functional Plant Biology*, 35:565-579. DOI: 10.1071/FP08004.
- Rose J. K., Lee H. H., Bennett A. B. (1997) Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:5955-60.
- Saeed H., Grove I. G., Kettlewell P. S., Hall N. W. (2008) Potential of partial rootzone drying as an alternative irrigation technique for potatoes (*Solanum tuberosum*). *Annals of Applied Biology*, 152:71-80. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2007.00196.x.
- Sagi M., Fluhr R., Lips S. H. (1999) Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a *flacca* tomato mutant with deficient abscisic acid and wilt phenotype. *Plant Physiology*, 120:571-578. DOI: 10.1104/pp.120.2.571
- Samarah N. (2005) Effect of drought stress on growth and yield of barley. *Agronomy for Sustainable Development*, 25:145-149. DOI: 10.1051/agro:2004064
- Savić S. (2008) Fiziološki mehanizmi regulacije produktivnosti paradajza (*Lycopersicon esculentum* L.) u uslovima stresa suše, Doktorska disertacija, Univerziteta u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Savić S., Stikić R., Vucelić Radović B., Bogičević B., Jovanović Z., Hadži-Tašković Škalović V. (2008) Comparative effects of regulated deficit irrigation (RDI) and partial root-zone drying (PRD) on growth and cell wall peroxidase activity in tomato fruits. *Scientia Horticulturae*, 117:15-20. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.03.009.
- Scholander P. F., Bradstreet E. D., Hemmingsen E. A., Hammel H. T. (1965) Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science*, 148:339-346. DOI: 10.1126/science.148.3668.339.

- Sepaskhah A.R., Ahmadi S. H. (2010) A review on partial root-zone drying irrigation. *International Journal of Plant Production*, 4:241-258.
- Setha S., Kondo S., Hirai N., Ohigashi H. (2004) Xanthoxin, abscisic acid and its metabolite levels associated with apple fruit development. *Plant Science*, 166:493-499. DOI: 10.1016/j.plantsci.2003.10.020.
- Shahnazari A., Liu F., Andersen M. N., Jacobsen S.-E., Jensen C. R. (2007) Effects of partial root-zone drying on yield, tuber size and water use efficiency in potato under field conditions. *Field Crops Research*, 100:117-124. DOI: 10.1016/j.fcr.2006.05.010.
- Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012:1-26. DOI: 10.1155/2012/217037.
- Sharp R. E. (2002) Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25:211-222. DOI: 10.1093/jexbot/53.366.33
- Sharp R. E., LeNoble M. E., Else M. A., Thorne E. T., Gherardi F. (2000) Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany*, 51:1575-84. DOI: 10.1093/jexbot/51.350.1575
- Sheng J., Ruan Y., Liu K., Shen L. (2008) Spatiotemporal relationships between abscisic acid and ethylene biosynthesis during tomato fruit ripening. *Acta Horticulturae*, 774:59-66. DOI: 10.17660/ActaHortic.2008.774.6
- Siggaard-Andersen M., Kauppinen S., Von Wettstein-Knowles P. (1991) Primary structure of a cerulenin-binding fi-ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase from barley chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88:4114-4118. DOI: 10.1073/pnas.88.10.4114
- Smirnoff N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125:27-58. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03863.x.
- Smith G. S., Klages K. U., Green T. G. A., Walton E. F. (1995) Changes in abscisic acid concentration, surface conductance, and water content of developing kiwifruit. *Scientia Horticulturae*, 61:13-27.

- DOI: 10.1016/0304-4238(94)00733-V.
- Sobeih W. Y., Dodd I.C., Bacon M.A., Grierson D., Davies W. J. (2004) Long-distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. *Journal of Experimental Botany*, 55:2353-2363. DOI: 10.1093/jxb/erh204.
- Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C., Masia A. (2004) Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science*, 166:293-302. DOI: 10.1016/j.plantsci.2003.09.018.
- Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C., Masia A. (2005) Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, 32:45. DOI: 10.1071/fp04003.
- Souza C. R., Maroco P., Santos T P. , Dos Rodrigues M. L., Lopes C. M., Pereira J.S., Chaves M. M. (2003) Partial rootzone drying: regulation of stomatal aperture and carbon assimilation in field-grown grapevines (*Vitis vinifera* cv. Moscatel). *Functional Plant Biology*, 30:653-662. DOI: 10.1071/FP02115.
- Srivastava A., Handa A. (2005) Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24:67-82. DOI: 10.1007/s00344-005-0015-0.
- Srivastava L. (2002) *Plant growth and development: hormones and environment*, Ed. Academic Press, pp. 772. ISBN: 012660570X.
- Stikić R., Jovanović Z. (2015) *Fiziologija biljaka*, Izd. Naučna KMD, str. 441. ISBN 978-86-6021-088-5
- Stikić R., Jovanović Z., Jacobsen S.E., Liu F., Jansen C.R. (2010) Deficit irrigation strategies: use of stress physiology knowledge to increase water use efficiency in tomato and potato, In: (Ed.) A.N. Sampson, *Horticulture in 21st Century*, Ed. Nova Science, pp. 161-178. ISBN: 978-1-61668-582-9.
- Stikić R., Popović S., Srdić M., Savić D., Jovanović Z., Prokić Lj., Zdravković J. (2003) Partial root drying (PRD): a new technique for growing plants that saves water and improves the quality the fruit. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 164–171.

- Stoll M., Loveys B. R., Dry P. (2000) Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 51:1627-1634. DOI: 10.1093/jexbot/51.350.1627.
- Sturm A. (1999) Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology*, 121:1–7. DOI: 10.1104/pp.121.1.1
- Sugiyama M., Komamine A. (1990) Transdifferentiation of quiescent parenchymatous cells into tracheary elements. *Cell Differentiation and Development*, 31:77-87. DOI: 10.1016/0922-3371(90)90011-K.
- Sung D. Y., Vierling E., Guy C. L. (2001) Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiology*, 126:789-800. DOI: 10.1104/pp.126.2.789.
- Tahi H., Wahbi S., El Modafar C., Aganchich A., Serraj R. (2008) Changes in antioxidant activities and phenol content in tomato plants subjected to partial root drying and regulated deficit irrigation. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 142:550-562. DOI: 10.1080/11263500802410900.
- Tahi H., Wahbi S., Wakrim R., Aganchich B., Serraj R., Centritto M. (2007) Water relations, photosynthesis, growth and water-use efficiency in tomato plants subjected to partial rootzone drying and regulated deficit irrigation. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 141:265-274. DOI: 10.1080/11263500701401927.
- Taiz L., Zeiger E. (2010) *Plant Physiology*, Ed. Sinauer Associates, pp. 781. ISBN: 0878935118
- Takač A., Gvozdenović Đ., Bugarski D., Červenski J. (2007) Savremena proizvodnja paradajza. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 43:269-281.
- Tal M., Imber D., Itai C. (1970) Abnormal stomatal behavior and hormonal imbalance in *flacca*, a wilted mutant of tomato. *Plant Physiology*, 46:367-372. DOI: 10.1104/pp.63.6.1044.
- Tanksley S. D. (2004) The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell*, 16:181-189. DOI:10.1105/tpc.018119.

- Tardieu F., Zhang J., Davies W. J. (1992) What information is conveyed by an ABA signal from maize roots in drying field soil? *Plant, Cell & Environment*, 15:185-191. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1992.tb01472.x.
- Taylor I. B., Linforth R. S. T., Al-Naieb R. J., Bowman W. R., Marples B. A. (1988) The wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant, Cell & Environment*, 11:739-745. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1988.tb01158.x.
- Thompson D. S. (2001) Extensiometric determination of the rheological properties of the epidermis of growing tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 52:1291-301. DOI: 10.1093/jexbot/52.359.1291.
- Thompson D. S., Davies W. J., Ho L. C. (1998) Regulation of tomato fruit growth by epidermal cell wall enzymes. *Plant, Cell & Environment* 21:589-599. DOI: 10.1046/j.1365-3040.1998.00308.x.
- Topcu S., Kirda C., Dasgan Y., Kaman H., Cetin M., Yazici A., Bacon M. A. (2007) Yield response and N-fertiliser recovery of tomato grown under deficit irrigation. *European Journal of Agronomy*, 26:64-70. DOI: 10.1016/j.eja.2006.08.004.
- Tyerman S. D., Niemietz C. M., Bramley H. (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment*, 25:173-194. DOI: 10.1046/j.0016-8025.2001.00791.x
- Umeda M., Hara C., Matsubayashi Y., Li H. H., Liu Q., Tadokoro F., Aotsuka S., Uchimiya H. (1994) Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Molecular Biology*, 25:469-78. DOI: 10.1007/BF00043875
- Van Ieperen W., Volkov V. S., Van Meeteren U. (2003) Distribution of xylem hydraulic resistance in fruiting truss of tomato influenced by water stress. *Journal of Experimental Botany*, 54:317-324. DOI: 10.1093/jxb/erg010.
- Van Schilfgaarde J. (1994) Irrigation — a blessing or a curse. *Agricultural Water Management*, 25:203-219. DOI: 10.1016/0378-3774(94)90061-2.

- Vicente A. R., Saladié M., Rose J. K. C., Labavitch J. M. (2007) The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87:1435-1448. DOI: 10.1002/jsfa.2837.
- Voll L. M., Hajirezaei M. R., Czogalla-Peter C., Lein W., Stitt M., Sonnewald U., Bornke F. (2009) Antisense inhibition of enolase strongly limits the metabolism of aromatic amino acids, but has only minor effects on respiration in leaves of transgenic tobacco plants. *New Phytologist*, 184:607-18. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02998.x.
- Vucelić Radović B., Savić S., Jovanović Z., Pauković M., Stikić R. (2008) Biochemical mechanisms of fruit growth regulation in drought stressed tomato plants. *Zemljište i biljka*, 57:129-138.
- Wakrim R., Wahbi S., Tahi H., Aganchich B., Serraj R. (2005) Comparative effects of partial root drying (PRD) and regulated deficit irrigation (RDI) on water relations and water use efficiency in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106:275-287. DOI: 10.1016/j.agee.2004.10.019.
- Wang F., Sanz A., Brenne L. M., Smith A. (1993) Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiology*, 101:321-327. DOI: 10.1104/pp.101.1.321
- Wang H., Lee P., Liu L., Su J. (1999) Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. *Botanical Bull Academia Sinica*, 40:219-225.
- Wang Y., Liu F., Andersen M. N., Jensen C. R. (2010) Carbon retention in the soil-plant system under different irrigation regimes. *Agricultural Water Management*, 98:419-424. DOI: 10.1016/j.agwat.2010.07.010.
- Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C., Redko Y., Jammes F., Valon C., Frei dit Frey N., Leung J. (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant*, 1:198-217. DOI: 10.1093/mp/ssm022.
- Wilkinson S. (1999) PH as a stress signal. *Plant Growth Regulation*, 29:87-99. DOI: 10.1023/a:1006203715640.
- Wilkinson S., Davies W. J. (1997) Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable

- abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiology*, 113:559-573. DOI: 10.1104/pp.113.2.559.
- Wilkinson S., Hartung W. (2009) Food production: reducing water consumption by manipulating long-distance chemical signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 60:1885-1891. DOI: 10.1093/jxb/erp121.
- Wilkinson S., Corlett J.E., Oger L., Davies W. J. (1998) Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and *flacca* tomato leaves. *Plant Physiology*, 117:703-709.
- Willumsem J., Petersen K., Kaack K. (1996) Yield and blossom-end rot of tomato as affected by salinity and cation activity ratios in the root zone. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 71:81-98.
- Wudiri B.B., Henderson D. W. (1985) Effects of water stress on flowering and fruit set in processing-tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 27:189-198. DOI: 10.1016/0304-4238(85)90022-6.
- Yachandra V. K., DeRose V. J., Latimer M. J., Mukerji I., Sauer K., Klein M. P. (1993) Where plants make oxygen: a structural model for the photosynthetic oxygen-evolving manganese cluster. *Science*, 260:675-9. DOI: 10.1126/science.8480177
- Yan S., Tang Z., Su W., Sun W. (2005) Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*, 5:235-244. DOI: 10.1002/pmic.200400853.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217:1214-1222. DOI: 10.1126/science.7112124.
- Zdravković J., Jovanović Z., Đorđević M., Girek Z., Zdravković M., Stikić R. (2013) Application of stress susceptibility index for drought tolerance screening of tomato populations. *Genetika*, 45:679-689. DOI: 10.2298/GENSR1303679Z.
- Zegbe-Domínguez J. A., Behboudian M. H., Lang A., Clothier B. E. (2003) Deficit irrigation and partial rootzone drying maintain fruit dry mass and enhance fruit quality in 'Petopride' processing tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Scientia Horticulturae*, 98:505-510. DOI: 10.1016/S0304-4238(03)00036-0.
- Zegbe J. A, Behboudian M. H., Clothier B. E. (2006a) Responses of 'Petopride' processing tomato to partial rootzone drying at different phenological stages. *Irrigation Science*, 24:203-210. DOI: 10.1007/s00271-005-0018-4.

- Zegbe J. A., Behboudian M. H., Clothier B. E. (2004) Partial rootzone drying is a feasible option for irrigating processing tomatoes. *Agricultural Water Management*, 68:195-206. DOI: 10.1016/j.agwat.2004.04.002.
- Zegbe J. A., Behboudian M. H., Clothier B. E. (2006b) Yield and fruit quality in processing tomato under partial rootzone drying. *European Journal of Horticultural Science*, 71:252–258.
- Zhang M., Yuan B., Leng P. (2009) The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 60:1579-1588. DOI: 10.1093/jxb/erp026.
- Zhang X., Liu S., Takano T. (2008) Overexpression of a mitochondrial ATP synthase small subunit gene (*AtMtATP6*) confers tolerance to several abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology Letters*, 30:1289-94. DOI: 10.1007/s10529-008-9685-6.
- Zobel R. W., Roberts L. W. (1978) Effects of low concentrations of ethylene on cell division and cytodifferentiation in lettuce pith explants. *Canadian Journal of Botany*, 56:987-990. DOI: 10.1139/b78-110.

Biografija autora

Milena Marjanović rođena je 25.09.1980. godine u Beogradu, Republika Srbija. Završila je Zemunsku gimnaziju u Beogradu, Prirodno-matematički smer. Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, upisala je školske 1999/2000. godine, a diplomirala 2006. godine iz predmeta Viroze bilja. Školske 2008/09. godine upisala je na Univerzitetu u Beogradu - Poljoprivrednom fakultetu, doktorske akademske studije, studijski program Poljoprivredne nauke, modul Zemljište i melioracije – uža naučna oblast Fiziologija gajenih biljaka.

Kao učesnik EU projekta CROPWAT i projekta bilateralne saradnje između Srbije i Francuske (program „Pavle Savić“), u toku 2009. godine je obavila 2-mesečnu specijalizaciju u francuskom Nacionalnom institutu za poljoprivredna istraživanja (INRA - National Institute for Agricultural Research, Avignon, France), u Odeljenju za genetiku i unapređenje voća i povrća. Svoju drugu specijalizaciju i trening u proteomik analizi je, kao dobitnik stipendije EU projekta COST-STSM-FA0603-03178 za mlade istraživače, obavila 2010. godine takođe u Institutu INRA. U naučnom zvanju istraživač pripravnik učestvuje u dva nacionalna projekta („Savremeni biotehnološki pristup rešavanja problema suše u poljoprivredi Srbije“ TR 31005 i „Novi koncept oplemenjivanja sorti i hibrida povrća namenjenih održivim sistemima gajenja uz primenu biotehnoloških metoda“ TR 31059) i jednom FP7 projektu (AREA).

U saradnji sa kolegama objavila je 21 bibliografsku jedinicu, od čega: jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), tri rada u međunarodnim časopisima (M23), dva saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33), devet saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M34), dva rada u časopisu od nacionalnog značaja (M52), dva rada u naučnim časopisima (M53), i jedno saopštenje sa nacionalnih skupova štampano u izvodu (M64). Ostvareni koeficijent naučne kompetentnosti prema Pravilniku Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije iznosi 33,7.

Član je Srpskog društva za fiziologiju biljaka (DFBS) i FESPB (Federation of European Societies for Plant Biology). Dobitnik je prve nagrade za najbolji poster na XVIII Simpozijumu Društva za fiziologiju biljaka Srbije u Vršcu, 2009. godine. Za vreme doktorskih studija pomagala je i u izvođenju vežbi iz predmeta Fiziologija biljaka.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: **Milena Marjanovic**

broj indeksa: **08/4**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

**„Fiziološki i biohemijski mehanizmi regulacije rastenja plodova paradajza
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) u uslovima suše“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 07. 10. 2015.

Milena Marjanovic

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Milena Marjanović**

Broj indeksa: **08/4**

Studijski program: **Poljoprivredne nauke, modul Zemljište i melioracije**

Naslov rada: **„Fiziološki i biohemijski mehanizmi regulacije rastenja plodova paradajza (*Lycopersicon esculentum* Mill.) u uslovima suše“**

Mentor: **Prof. dr Radmila Stikić**

Potpisani/a **Milena Marjanović**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 07. 10. 2015.

Milena Marjanović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Fiziološki i biohemijski mehanizmi regulacije rastenja plodova paradajza (*Lycopersicon esculentum* Mill.) u uslovima suše“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

☒ 2. **Autorstvo - nekomercijalno**

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 07.10.2015.

Munira Marjanović

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.